

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Nikola Štěpánová**

Vliv aplikace *meta*-topolinu na průběh somatické embryogeneze smrku ztepilého  
The effect of *meta*-topolin application on Norway spruce somatic embryogenesis

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2020



Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 8.6.2020

Podpis:



Diplomová práce byla vypracována za podpory projektu GAUK č. 1604218.

Na tomto místě bych ráda poděkovala:

- RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, morální podporu, trpělivost a čas, které mi během vedení diplomové práce věnovala.
- doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za náměty a připomínky k zamyšlení, morální podporu a trpělivost během vypracování diplomové práce.
- Mgr. Monice Kofroňové, Ph.D. za cenné rady při práci v laboratoři a pomoc při stanovení obsahu vybraných antioxidačních látek.
- RNDr. Editě Tylové, Ph.D. a Mgr. Marku Širlovi za pomoc při anatomické analýze a při práci s mikroskopem.
- RNDr. Barboře Radochové, Ph.D. za konzultaci při analýze poměrného zastoupení meristematických oblastí.
- Mgr. Karlu Doležalovi, Dr., DSc. za konzultaci při výběru cytokininu.
- Ing. Václavu Motykovi, CSc. za stanovení obsahu vybraných fytohormonů.
- celému týmu laboratoře 007 za přátelskou atmosféru, ochotu kdykoliv poradit a pomoci.
- své rodině a přítelovi za podporu a trpělivost během celé doby mého vysokoškolského studia.

## ABSTRAKT

Somatická embryogeneze představuje jednu z možných metod vegetativního množení jehličnanů, především pokud dojde k selhání množení obvyklým způsobem. Širšímu využití této technologie ve velkém měřítku brání několik přetrvávajících problémů (např. nízký počet vytvořených kvalitních somatických embryí (SE), omezená stabilita embryogenní kapacity kultur a mnoho dalších), a to i u relativně dobře experimentálně zmapovaných druhů.

S cílem přispět k odstranění některých slabin spojených s touto metodou, jsem sledovala vliv změny aplikovaného aromatického cytokininu během proliferace. Nahradila jsem běžně používaný 6-benzylaminopurin (BAP) jeho hydroxylovaným derivátem - *meta*-topolinem (*mT*). Literární data naznačují, že tato záměna by mohla představovat slibnou změnu, která by mohla vyřešit některé z problémů, např. problém s nedostatečným množstvím vytvořených somatických embryí či rozsáhlý problém se stárnutím embryogenních kultur.

Pracovala jsem se stabilní, dobře rostoucí embryogenní linií smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.), konkrétně se jednalo o linii C odvozenou naším týmem. Vývoj této linie jsem podrobně zmapovala se závěrem, že linie C vykazovala dobrou embryogenní kapacitu a řadu dalších charakteristik společných s liniemi, které byly v minulosti využívány jako modelové. Z tohoto důvodu je velice pravděpodobné, že reakce této linie na změnu aplikovaného cytokininu by měla širší platnost, a tedy i případné praktické využití.

V této práci byla při aplikaci *mT* u linie C zjištěna signifikantně vyšší výtěžnost SE v porovnání s BAP a kromě toho nebyl při aplikaci *mT* pozorován negativní vliv na vývoj SE během maturace. Provedené analýzy naznačují, že zvýšení výtěžnosti je doprovázeno změnou v některých antioxidačních systémech (kyselina askorbová a glutathion) a odráží se i ve změně rychlosti vývoje SE. Během práce se potvrdil význam záměny cytokininu v proliferaci projevující se na následující maturaci, kdy již kultura nebyla efektu změny cytokininu přímo vystavena.

**Klíčová slova:** 6-benzylaminopurin, aromatické cytokininy, maturace, *meta*-topolin, proliferace smrk ztepilý, somatická embryogeneze

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis represents one of the possible methods of vegetative propagation in conifers, especially when traditional propagation ways fail. Several persistent problems prevent the wider use of this technology on a large scale (e.g. low number of high-quality somatic embryos (SE), limited stability of embryogenic capacity of cultures and many others), and even in relatively well experimentally mapped species.

In order to contribute to the elimination of some weak points associated with this method, I studied the effect of change in the applied aromatic cytokinins during proliferation. I replaced usually used 6-benzylaminopurine (BAP) with its hydroxylated derivative - *meta*-topolin (*mT*). Literature data indicate that this substitution might represent a promising change that could have solve some of problems, e.g. insufficient number of somatic embryos formed or common problem with aging of embryogenic cultures.

I worked with a stable, well-growing embryogenic line of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) derived by our team (line C). I performed the detailed description of the line C development with the conclusion that it showed good embryogenic capacity along with a number of other characteristics common to the lines that were used as model ones in the past. For this reason, it is very likely that the response of this line to altering of applied cytokinin would have a wider validity, and thus a possible practical use.

In this work, a significantly higher yield of SE was found in connection with the application of *mT* compared to BAP. Moreover, no negative effects related to *mT* application on the development of SE during maturation were observed. The performed analyses showed that the increase in yield was accompanied by a change in monitored antioxidant systems (ascorbic acid and glutathione) and was also reflected in a slight change in the speed of SE development. During the work, the importance of cytokinin replacement in the proliferation for performance in the subsequent maturation was confirmed, though the maturing culture was no longer exposed to the cytokinin application.

**Key words:** 6-benzylaminopurine, aromatic cytokinins, maturation, *meta*-topolin, Norway spruce, proliferation, somatic embryogenesis

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce .....	2
2.1	Dílčí cíle:.....	2
3	Hypotézy .....	2
4	Literární přehled.....	3
4.1	Somatická embryogeneze u jehličnanů.....	3
4.2	Využití somatické embryogeneze.....	4
4.3	Problémy spojené s procesem somatické embryogeneze.....	4
4.4	Popis jednotlivých fází somatické embryogeneze.....	5
4.4.1	Indukce a proliferace.....	5
4.4.2	Maturace.....	6
4.4.3	Desikace .....	6
4.4.4	Klíčení a přeměna v rostlinu.....	7
4.4.5	Aklimatizace a přenos rostlin do podmínek <i>ex vitro</i> .....	7
4.5	Nahrazení 6-benzylaminopurinu za <i>meta</i> -topolin během somatické embryogeneze.....	7
4.6	Cytokininy.....	7
4.6.1	Aromatické cytokininy.....	8
4.6.1.1	Vliv BAP a <i>mT</i> na množení, případně kvalitu výhonů .....	10
4.6.1.2	Vliv BAP a <i>mT</i> na zakořeňování a aklimatizaci při přenosu do podmínek <i>ex vitro</i> ..	11
4.6.1.3	Vliv BAP a <i>mT</i> na různé fyziologické abnormality, hyperhydricitu.....	13
5	Materiál a metody .....	14
5.1	Rostlinný materiál .....	14
5.2	Kultivace.....	14
5.2.1	Proliferace (Udržování/množení embryogenní kultury) .....	14
5.2.2	Maturace (Zrání embryogenní kultury).....	14
5.2.3	Složení a příprava kultivačních médií.....	14
5.2.3.1	Proliferační médium.....	14
5.2.3.2	Maturační médium .....	16
5.3	Provedené analýzy.....	16
5.3.1	Počet zralých SE v 5. a 6. týdnu maturace .....	16
5.3.2	Výtěžnost.....	16



5.3.3	Analýza obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu .....	16
5.3.3.1	Odběr materiálu .....	16
5.3.3.2	Příprava vzorků pro analýzu nestrukturních sacharidů .....	17
5.3.3.3	Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů .....	17
5.3.3.4	Výpočet pro stanovení obsahu sacharidů .....	17
5.3.3.5	Příprava vzorků pro stanovení obsahu škrobu .....	18
5.3.3.6	Stanovení obsahu škrobu .....	18
5.3.4	Anatomická analýza .....	18
5.3.4.1	Odběr materiálu .....	18
5.3.4.2	Příprava trvalých preparátů .....	19
5.3.4.3	Průběh a časování maturace a kvantitativní analýza struktur .....	20
5.3.4.4	Poměrné zastoupení meristematických oblastí .....	20
5.3.5	Biochemické stanovení obsahu fenolických látek .....	21
5.3.5.1	Odběr materiálu .....	21
5.3.5.2	Příprava vzorků .....	22
5.3.5.3	Spektrofotometrické stanovení .....	22
5.3.6	Stanovení obsahu kyseliny askorbové .....	23
5.3.6.1	Odběr materiálu .....	23
5.3.6.2	Příprava vzorků .....	23
5.3.6.3	Spektrofotometrické stanovení .....	23
5.3.7	Stanovení obsahu glutathionu .....	24
5.3.7.1	Odběr materiálu .....	24
5.3.7.2	Příprava vzorku pro stanovení obsahu GSSG .....	25
5.3.7.3	Příprava blanku na GSSG .....	25
5.3.7.4	Příprava vzorku pro stanovení obsahu GSH .....	25
5.3.7.5	Spektrofotometrické stanovení .....	25
5.3.8	Stanovení obsahu vybraných fytohormonů .....	26
5.3.8.1	Odběr materiálu .....	26
5.4	Zpracování dat .....	26
5.5	Přehled jednotlivých experimentů a jejich využití pro jednotlivé typy analýz .....	27
6	Výsledky .....	28
6.1	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na počet zralých SE .....	28
6.2	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na výtěžnost .....	29

6.3	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na průběh maturace a na velikost kotyledonárních SE.....	30
6.4	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na poměrné zastoupení plochy meristematických oblastí.....	32
6.5	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na obsah a spektrum endogenních nestrukturních sacharidů .....	33
6.6	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na obsah škrobu.....	34
6.7	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na obsah celkových fenolických látek.....	35
6.8	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na obsah kyseliny askorbové .....	37
6.9	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na obsah a podíl forem glutathionu .....	37
6.10	Vliv záměny BAP za <i>mT</i> na obsah vybraných fytohormonů.....	38
7	Diskuze.....	42
7.1	Výtěžnost zralých SE.....	42
7.2	Strukturní vývoj SE .....	43
7.3	Markery pravidelného vývoje .....	44
7.4	Antioxidační systémy .....	46
7.5	Fytohormony .....	48
8	Závěr .....	50
9	Seznam použité literatury .....	51



## Seznam použitých zkratek

(OG)[9R] <i>mT</i>	N <sup>6</sup> -(3-O-β-D-glukopyranosyl) benzylaminopurin-9-ribosid
[9G]BAP	N <sup>6</sup> -benzylaminopurin-9-glukosid
2,4-D	2,4 - dichlorofenoxycetová kyselina
9OH-ABA	9-hydroxy-abscisová kyselina
ABA	kyselina abscisová
ABA-GE	kyselina abscisová glukosylester
ASC	kyselina askorbová (redukovaná forma kyseliny askorbové)
BAP	6-benzylaminopurin
BzA	kyselina benzoová
cisOPDA	cis-12-oxo-fytodienová kyselina
CO	kotyledonární embryo
CY	cylické embryo
DHA	dehydroaskorbát (oxidovaná forma kyseliny askorbové)
DHZ	dihydrozeatin
DPA	kyselina dihydrofazeová
ESE	rané somatické embryo
ESM	embryonálně suspenzorová hmota
FAA	formaldehyd/kyselina octová/ 50 % etanol
GD	Gupta and Durza médium
GSH	redukovaná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
HEX	hexózy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indol-3-octová
IAA-Asp	kyselina indol-3-octová- aspartát
IAM	indol-3-acetamid
iP	izopentenyladenin
JA	kyselina jasmonová

JA-Ileu	kyselina jasmonová-isoleucin
KIN	kinetin
KOH	hydroxid draselný
M2VP	1-methyl-2-vinyl pyridium trifluorometan sulfonát
MemT	<i>meta</i> -metoxytopolin = 6-(3-metoxybenzylamino)purin
MemTR	<i>meta</i> -metoxytopolin ribosid
MeoT	<i>orto</i> -metoxytopolin = 6-(2-metoxybenzylamino)purin
MeoTR	<i>orto</i> -metoxytopolin ribosid
MPA	kyselina metafosforečná
<i>m</i> T	<i>meta</i> -topolin = (6-(3-hydroxybenzylamino)purin)
NAA	kyselina naftyloctová
NeoPA	kyselina neofazeová
<i>o</i> T	<i>orto</i> -topolin = (6-(2-hydroxybenzylamino)purin))
OxIAA	oxo-indol-3-octová kyselina
PA	kyselina fazeová
PAA	kyselina fenylloctová
PEG	polyethylenglykol
PEMs	proembryonální hmota
PRE	prekotyledonární embryo
<i>p</i> T	<i>para</i> -topolin
SA	kyselina salicylová
SE	somatická embrya
SUC	sacharóza
Z	zeatin

# 1 Úvod

Přestože byla první somatická embrya (SE) jehličnanů úspěšně odvozena a kultivována před více než 30 lety (Chalupa, 1985; Hakman and von Arnold, 1985) a od té doby bylo významně prohloubeno porozumění celému procesu somatické embryogeneze, tak se stále vyskytují určitá slabá místa a nevyřešené otázky. Ty často limitují využití tak významného morfogenního procesu v praxi ve velkém měřítku. Proto se i v současné době intenzivně pracuje na minimalizaci či úplné eliminaci vyskytujících se problémů a případné optimalizaci celého procesu na základě nejnovějších poznatků.

Somatická embryogeneze je ovlivněna mnoha různorodými faktory, nicméně za klíčový faktor je považováno působení fytohormonů. U jehličnanů jsou k indukci a následné proliferaci embryogenní kultury ve většině případů potřeba auxiny společně s cytokininy. Nejčastěji používanými cytokininy během somatické embryogeneze jehličnanů jsou kinetin (KIN) a 6-benzylaminopurin (BAP) (Elhiti and Stasolla 2012). Nicméně s použitím BAP během mikropagace jsou spojeny různé negativní efekty - např. problémy s tvorbou kořenů, hyperhydricitou, přežitím rostlin při přenosu do nesterilních podmínek a mnoho dalších (Aremu et al., 2012a).

Kvůli problémům se hledají vhodné alternativy, které by použití BAP nahradily. Slibnou možnost představovala záměna BAP za hydroxylovaný derivát BAP - *meta*-topolin (*mT*). Použití *mT* v mnoha studiích u různých rostlinných druhů vykazovalo pozitivní vliv na různé morfogenní, fyziologické i vývojové procesy, jak při kultivaci *in vitro*, tak při ošetření *in vivo*. V tuto chvíli mi nejsou známy žádné studie, které by se zabývaly tématem vlivu *meta*-topolinu na proces somatické embryogeneze u jehličnanů. Předpokládala jsem, že nahrazení BAP za *mT* během proliferace by mohlo pozitivním způsobem ovlivnit proces somatické embryogeneze.

## 2 Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo sledovat vliv záměny 6-benzylaminopurinu (BAP) za *meta*-topolin (*mT*) během proliferace na vybrané charakteristiky embryogenní kultury v proliferaci a maturaci. S využitím získaných dat přispět k objasnění role aplikovaného cytokininu na vztah a relevanci vybraných jednotlivých charakteristik pro efektivní vývoj somatických embryí (SE) smrku ztepilého.

### 2.1 Dílčí cíle:

Sledovat vliv záměny BAP za *mT* na

- počet zralých SE na konci maturace
- strukturní vývoj SE z hlediska nástupu a průběhu jednotlivých vývojových stádií a z hlediska velikosti kotyledonárních SE.
- poměrné zastoupení meristematických oblastí v proliferaci a na počátku maturace
- obsah celkových nestrukturních sacharidů a škrobu jakožto markeru pravidelného vývoje.
- redoxní rovnováhu pletiv - pomocí stanovení obsahu, případně podílu vybraných antioxidačních látek (kyseliny askorbové, glutathionu) a pomocí stanovení obsahu celkových fenolických látek.
- obsah vybraných fytohormonů.

## 3 Hypotézy

Nahrazením BAP za *mT* v proliferaci

- se zvýší počet zralých SE na konci maturace (výťažnost procesu).
- selepší kvalita vyvíjejících se SE.
- se urychlí vývoj SE během maturace.
- se změní redoxní rovnováha kultur.
- dojde k ovlivnění hladin fytohormonů, které může přetrvávat až do maturace na základě různé stability degradačních produktů.

## 4 Literární přehled

### 4.1 Somatická embryogeneze u jehličnanů

Somatická embryogeneze je sled složitých vzájemně navazujících procesů, během kterých se ze somatických (tělních) buněk vytváří embrya. Jedná se tedy o vegetativní způsob množení. Celý proces probíhá v podmínkách *in vitro* a skládá se z několika základních fází - indukce (odvození) embryogenní kultury, proliferace (množení), maturace (zrání), desikace (vysoušení), klíčení a nakonec dochází k přeměně v mladou rostlinu (shrnutí např. Egertsdotter, 2019).

K odvození embryogenní kultury se vybraný explantát umístí na indukční médium, které obsahuje vhodné růstové regulátory. U naprosté většiny krytosemenných rostlin se odvození embryogenní kultury navodí pouze působením auxinů, na druhou stranu u jehličnanů jsou ve většině případů k odvození embryogenní kultury a následnému množení SE potřeba auxiny společně s cytokininy (Vagner et al., 1998), např. u rodu *Picea* a *Pinus* (Bozhkov et al., 1997; Hazubská-Przybyl and Bojarczuk, 2008), nicméně u rodu *Abies* stačí pro indukci embryogenní kultury pouze cytokininy (Salajova et al., 1996). Během indukce dochází k tvorbě nezralých raných SE. Tato embrya se následně množí na proliferačním médiu, jehož složení je většinou shodné s médiem indukčním, obsahuje tedy i stejné růstové regulátory. Během proliferace dochází k množení SE a tvoří se kultura raných SE, která se nazývá embryonálně suspenzorová hmota (ESM) (Gautier et al., 2019) nebo také proembryonální hmota (PEMs) (Mamun et al., 2018). Pokud poté dojde k přemístění ESM na médium s kyselinou abscisovou (ABA), již bez přítomnosti ostatních růstových regulátorů, dochází k zastavení množení a raná SE se vyvíjejí ve zralá SE (Hakman and Von Arnold, 1985). Zralá SE se dále případně mohou nechat vysušit, následně mohou vyklíčit a nakonec se přemění v mladou rostlinu (shrnutí např. Egertsdotter, 2019; Stasolla and Yeung, 2003).

U jehličnanů představují auxiny a cytokininy klíčové růstové regulátory, které zajišťují jednak odvození embryogenní kultury, tak i její proliferaci (Egertsdotter, 2019). Spíše než absolutní obsahy auxinů a cytokininů reguluje vývoj SE v raných fázích somatické embryogeneze jejich vzájemná rovnováha či jejich poměr. Nejčastěji používanými auxiny během somatické embryogeneze jehličnanů jsou kyselina 2,4 – dichlorfenoxycetová (2,4-D) (Bozhkov and von Arnold, 1998; Filonova et al., 2000) a kyselina naftyloctová (NAA) (Ramarosandratana and Van Staden, 2003). V případě nepřítomnosti auxinu v médiu se kultura vyvíjí velmi pomalu a poskytuje méně kvalitní raná SE. Mezi nejčastěji používané cytokininy během somatické embryogeneze jehličnanů patří kinetin (KIN) a 6-benzylaminopurin (BAP) (Stasolla and Yeung, 2003). Dalším klíčovým fytohormonem je ABA, která zastavuje multiplikaci (množení) SE a synchronizuje další vývoj. Část stávajících raných SE nezaniká a pokračuje v dalším vývoji a část stávajících raných SE ve vývoji nepokračuje a posléze zaniká. Po dozrání SE už další vývoj probíhá bez přítomnosti růstových regulátorů v médiu (shrnutí např. Elhiti and Stasolla, 2012; Vondráková et al., 2016).

Pro úspěšné dokončení celého procesu somatické embryogeneze je důležité, aby jednotlivé fáze proběhly za optimálních podmínek. Pravidelný vývoj v jednotlivých fázích podmiňuje kvalitu každé následující fáze. Pokud by došlo k narušení normálního vývoje



embryogenní kultury, kultura by nebyla schopná dále růst a vyvíjet se (Stasolla and Yeung, 2003). Celá somatická embryogeneze je velice komplexní proces a úspěch tohoto procesu je ovlivněn mnoha faktory v různých rovinách pohledu, počínaje typem a stářím explantátu, přes potenciál explantátů produkovat embryogenní kulturu až po složení kultivačního média a podmínek kultivace (Hazubská-Przybyl and Bojarczuk, 2008). Úspěch somatické embryogeneze je dán také kvalitou odvozené embryogenní linie, která je určena schopností vytvářet raná SE, výnosem (tj. počet a kvalita zralých SE), schopností embryí klíčit a pokračovat v dalším vývoji po převedení rostlin do nesterilních podmínek. Všechny tyto výše uvedené faktory jsou často specifické pro konkrétní embryogenní linii určitého druhu. Nicméně by se dalo říct, že klíčovým faktorem, který řídí jednak vznik a vývoj embryogenní kultury, ale i zrání SE, jsou růstové regulátory (fytormony). Právě změny obsahu růstových regulátorů v médiu vyvolávají změny ve vývoji SE a umožňují tak celkové řízení procesu (shrnutí např. Elhiti and Stasolla, 2012).

## **4.2 Využití somatické embryogeneze**

V praxi je somatická embryogeneze považována za slibnou technologii pro klonální množení jehličnanů ve velkém měřítku. Embryogenní kultura založená z jednoho primárního explantátu dává vznik velkému množství SE (Mamun et al., 2018). Je tedy možné vyprodukovat velké množství geneticky identických rostlin během relativně krátké doby, což je velmi důležité především u druhů, které nelze snadno množit jiným způsobem (např. tradičním řízkováním). Dále pak je možné embryogenní kultury kryoprezervovat (hluboce zmrazit v prostředí tekutého dusíku), tudíž lze dlouhodobě uchovávat různé genetické zdroje a udržet tak jejich vysokou embryogenní kapacitu. V neposlední řadě je somatická embryogeneze vhodným experimentálním modelovým systémem pro studium embryonálního vývoje jehličnanů (Gautier et al., 2018; Lelu-Walter et al., 2013).

## **4.3 Problémy spojené s procesem somatické embryogeneze**

Navzdory tomu, že je proces somatické embryogeneze u jehličnanů intenzivně a dlouhodobě zkoumán mnoha laboratořemi po celém světě a vede k uspokojivé produkci SE, se stále vyskytuje několik nedorozumění či problémů či slabin, které brání jejímu plnohodnotnému použití v praxi. Mezi hlavní slabiny patří různá rezpozivita různých druhů či genotypů v jednotlivých fázích vývoje na ošetření při kultivaci *in vitro*. Např. rod *Picea* obecně velmi dobře reaguje na použití standardních technik *in vitro* v porovnání např. s rodem *Pinus* (Egertsdotter, 2019). Kromě toho se často během proliferace tvoří nízký počet SE a následně během maturace dozrává nízký počet SE, která jsou posléze schopná přeměnit se v životaschopnou rostlinu. S nízkým počtem zralých SE souvisí to, že se embrya v rámci ESM během časného vývoje nenacházejí ve stejném stádiu vývoje. Pokud by došlo k lepší synchronizaci časného vývoje SE, tak by se pravděpodobně zvýšil počet embryí, které dozrají a posléze jsou schopna pokračovat v dalším vývoji (Mamun et al., 2018). Další slabinou je omezená stabilita embryogenní kapacity kultur. Po předem obtížně odhadnutelné době dochází často ke snížení výtěžnosti kultury. Mimo to somatická embryogeneze představuje pracnější a

finančně náročnější vegetativní způsob množení (Lelu-Walter et al., 2013). Z těchto důvodů je stále nutné pracovat na optimalizaci a zefektivnění celého procesu somatické embryogeneze.

## **4.4 Popis jednotlivých fází somatické embryogeneze**

### **4.4.1 Indukce a proliferace**

První fází somatické embryogeneze je indukce, taktéž odvození embryogenní kultury, která se následně stává zdrojem SE. Klíčovým krokem indukce je výběr explantátu, který je závislý na genotypu. U jehličnanů se embryogenní kultura odvozuje téměř vždy z velmi mladých částí - často se používají celá nezralá zygotická embryo v prekotyledonární fázi (např. Hakman and Von Arnold, 1985), případně zralá kotyledonární embryo (např. Hazubska-Przybyl and Bojarczuk, 2008), dále části děloh, případně celé samičí gametofyty (např. Krogstrup, 1986). V literatuře existuje i nemnoho prací, které používají explantáty z dospělých částí rostliny, např. ze sazenic smrku (např. Attree et al., 1990), případně jehlice stromku (např. Ruaud et al., 1992). Taktéž lze odvodit embryogenní kulturu z již existujících SE (jedná se o tzv. repetitivní embryogenezi) (např. Gautier et al., 2018; Hazubska-Przybyl and Bojarczuk, 2008).

Dále kromě výběru explantátu závisí indukce na volbě vhodného složení média, které se liší pro jednotlivé druhy jehličnanů. Mezi důležité faktory média patří nejčastěji typ a koncentrace růstových regulátorů (viz kapitola 4.1), sacharidů, pH, typ a koncentrace zdroje dusíku (Tautorus et al., 1991).

U smrku ztepilého se po několika týdnech kultivace ve tmě na vhodném kultivačním médiu začíná tvořit embryogenní kultura. Ta je na rozdíl od neembryogenního pletiva, které je tmavé, průhledná a tvořená masou nezralých SE (=embryonálně suspenzorovou hmotou, ESM). V rámci ESM rozlišujeme 2 odlišné typy buněk. Prvním typem jsou buňky meristematické, jedná se o malé buňky s velmi hustou cytoplazmou, jejichž spojením se tvoří tzv. embryonální hlavy (embryonal heads). Druhým typem jsou buňky suspenzorové, které jsou delší, protáhlé a vysoce vakuolizované, jedná se o buňky vyživující a podpůrné. Často jsou také přítomna SE s širokou embryonální oblastí, která umožňují vznik několika embryí díky štěpné polyembryonii (Svobodova et al., 1999).

Během proliferace, taktéž proces množení (multiplikace) embryí, nastává kontinuální zmnožení, respektive obnova kultury. Postupně dochází k rozpadu nezralých SE a polyembryogenních center, zároveň se však tvoří nová SE, která se opět zvětšují a znovu se rozpadají. Tento proces se neustále opakuje (Vondrakova et al., 2015). Během proliferace je embryogenní kultura asynchronní, tzn., že se embryo nenacházejí ve stejném stádiu vývoje, či rozpadu. Bývají přítomna jednak vznikající raná SE tvořená několika málo meristematickými a suspenzorovými buňkami, zároveň se často vyskytují velká nezralá, ale dobře vyvinutá SE. Dále jsou často přítomna polyembryogenní centra, rozpadající se SE v různém stádiu rozpadu a také jednotlivé suspenzorové buňky (Elhiti and Stasolla, 2012; Stasolla and Yeung, 2003). Embryogenní kultura se obvykle množí na médiu se stejným složením jako médium indukční, případně se modifikuje množstvím růstových regulátorů (Stasolla et al., 2002).

#### 4.4.2 Maturace

Během maturace (taktéž zrání) dochází k přeměně raného SE ve zralé SE. Na začátku maturace dojde k zastavení množení SE tím, že se do média již nepřidávají auxiny a cytokininy. Dalším kritickým krokem je přidání ABA do maturačního média, která je důležitá pro úspěšné dokončení embryonálního vývoje. Bylo totiž zjištěno, že vyvíjející se semena (kde hlavním zdrojem ABA pro vyvíjející se embryo je megagametofyt) mají vyšší obsah endogenní hladiny ABA než SE bez exogenního dodání ABA (Kong et al., 1997). ABA pozitivně ovlivňuje počet a kvalitu SE a mimo to i další vývoj SE, především správnou regeneraci kotyledonárních embryí. Dále ABA zamezuje předčasnému klíčení a podporuje efektivnější ukládání zásobních látek (Bozhkov et al., 2002; Hakman and Von Arnold, 1985). Navíc má ABA v kombinaci s použitím penetrujícího osmotika (nejčastěji sacharóza), případně nepenetrujícího osmotika (nejčastěji polyetylglykol, např. PEG 4000 a vyšší) často pozitivní vliv na snížení osmotického potenciálu, ale zvýšení osmotického tlaku média (Attree et al., 1991).

Na začátku maturace se embryo nacházejí ve stádiu raného SE, u kterého se postupně začíná zvětšovat meristematická oblast díky buněčnému dělení. Meristematická oblast je stále spojena se suspenzorovými buňkami, které se pomalu vakuolizují. Postupně dochází k prodlužování meristému. Přibližně v polovině maturace se embryo polarizují. Na bazální straně se začíná tvořit kořenová čepička a základ kořenového meristému. Na apikální straně se objevuje základ apikálního meristému. V tuto chvíli přestává být embryo závislé na suspenzoru, který postupně odumírá. Ve stejnou dobu se začínají tvořit prokambióální provazce, které představují základ pro vodivá pletiva. Ke konci maturace se embryo stále prodlužuje a dochází k dokončení tvorby děloh (Svobodova et al., 1999). Kvalitní zralé SE je štíhlé, kompaktní, má dobře vyvinuté dělohy, apikální a kořenový meristém a prokambióální provazce. Jak bylo uvedeno výše, do procesu maturace vstupuje embryogenní kultura v asynchronním stavu, tudíž ne všechna SE jsou schopna dokončit zrání, na konci maturace zůstává mnoho SE nedovyvinutých (Vondrková et al., 2015).

Pro úplné dokončení maturace je nezbytné, aby embryo dosáhla morfologické a fyziologické zralosti. Během maturace dochází k ukládání zásobních látek- sacharidů, proteinů a lipidů (Lipavská and Konradová, 2004). Tyto rezervy jsou použity k navození tolerance k vysychání a také poskytují živiny pro embryo během klíčení (Businge et al., 2013). Morfologicky zralé embryo se stává zcela fyziologicky zralé často až během procesu desikace.

#### 4.4.3 Desikace

Během desikace (pomalého vysoušení za vysoké vzdušné vlhkosti) se SE stává zcela fyziologicky zralé a je schopné pokračovat v dalším vývoji. Dochází k tomu hlavně díky snížení obsahu vody v embryu a také díky snížení endogenní hladiny ABA, která byla přítomna ve vysokých koncentracích během maturace (Stasolla and Yeung, 2003). Většina morfologicky zralých SE obtížně klíčí, pravděpodobně kvůli vysoké hladině ABA. Nicméně byly popsány i další patrně významné metabolické změny, které jsou s desikační fází spojeny (např. syntéza sacharidů s ochrannou funkcí – rafinózy a stachyózy) (Hudec et al., 2016). Bylo zjištěno, že pokud je mezi

maturaci a klíčení vložena desikace, dochází ke zlepšení úspěšnosti a synchronizaci klíčení (Kermode, 1990).

#### **4.4.4 Klíčení a přeměna v rostlinu**

Klíčení je zahájeno přemístěním zralých vysušených SE na médium bez růstových regulátorů a s nižším obsahem sacharózy. Během této fáze dochází nejprve k růstu hlavního kořene a následně se vyvíjí nadzemní část rostliny, která se stává plně autotrofní (Stasolla and Yeung, 2003).

#### **4.4.5 Aklimatizace a přenos rostlin do podmínek *ex vitro***

Po dosažení vhodné velikosti jsou mladé rostliny přeneseny do půdy ve skleníku. Přenos rostlin do podmínek *ex vitro* je spojován se stresem. Při porovnání s normálními sazenicemi rostliny odvozené cestou somatické embryogeneze rostou v prvních fázích vývoje v podmínkách *ex vitro* pomaleji. Úspěch aklimatizace závisí na vhodných podmínkách, jako je vysoká vzdušná vlhkost, nižší ozáření, vhodná teplota, a také závisí na správné péči, jako je např. ochrana proti chorobám a škůdcům, atd. (Grossnickle et al., 1996).

### **4.5 Nahrazení 6-benzylaminopurinu za *meta*-topolin během somatické embryogeneze**

Somatická embryogeneze představuje významný morfogenní proces, se kterým je nicméně spojeno několik nedorozřešených problémů bránící plnohodnotnému využití v praxi (viz kapitola 4.3). Jak již bylo uvedeno výše, klíčovým faktorem ovlivňujícím somatickou embryogenezi jsou fytohormony – u jehličnanů jsou to ve většině případů především auxiny, cytokininy a ABA.

Ovšem na základě prostudované literatury představovala záměna v aplikaci cytokininů změnu, která by mohla pozitivně ovlivnit proces somatické embryogeneze a vyřešit tak některé problémy spojené s tímto procesem. Konkrétně jsem zaměnila běžně používaný 6-benzylaminopurin (BAP) za hydroxylovaný derivát BAP- *meta*-topolin (*mT*). V mnoha studiích se *mT* jeví jako lepší alternativa k BAP (Aremu et al., 2012a). V další části literárního přehledu se proto blíže věnuji studiím, které se týkají cytokininů a sledují či porovnávají vliv BAP a *mT* na různé morfogenní procesy během mikropropační praxe. Většina těchto studií se týká regenerace, regenerace *de-novo* či organogeneze. Mně v tuto chvíli nejsou známy žádné studie, které by sledovaly či porovnávaly vliv BAP a *mT* na somatickou embryogenezi jehličnanů.

### **4.6 Cytokininy**

Cytokininy představují jednu z nejdůležitějších skupin fytohormonů (růstových regulátorů), které mají schopnost regulovat růst a vývoj rostlin a koordinovat mnoho různých fyziologických procesů (např. stimulují buněčné dělení, zpomalují stárnutí, zpomalují degradaci chlorofylu, stimulují větvení, potlačují apikální dominanci a další). Cytokininy patří v mikropropační praxi mezi jedny

z nejčastěji používaných růstových regulátorů. Typ a koncentrace cytokininů a auxinů a jejich vzájemná interakce při stimulaci buněčného dělení a regulaci diferenciaci buněk patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující růst a vývoj kultur *in vitro*. Nicméně vystavení nevhodnému cytokininu či auxinu, případně vystavení nevhodné koncentraci, může mít negativní efekt na následné kroky mikropropagace. Tyto problémy poté omezují aplikaci technik *in vitro* u některých rostlinných druhů (Van Staden et al., 2008).

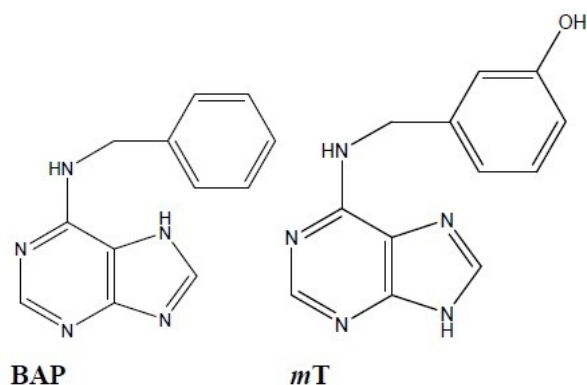
Přirozeně se vyskytující cytokininy tvoří skupinu derivátů N<sup>6</sup>-substituovaného adeninu, tzn. adenin nese na dusíku N<sup>6</sup> postranní řetězec. Cytokininy dělíme podle povahy N<sup>6</sup> postranního řetězce na 2 skupiny: izoprenoidní a aromatické. Mezi izoprenoidní cytokininy patří izopentenyladenin (iP), dihydrozeatin (DHZ), zeatin (Z) a jejich deriváty. Mezi aromatické cytokininy patří kinetin (KIN), 6-benzylaminopurin (BAP), *orto*-, *meta*- a *para*-topolin (*oT*, *mT*, *pT*) a jejich deriváty. V minulosti se dostávalo větší pozornosti izoprenoidním cytokininům, především kvůli jejich vyšší koncentraci v rostlinných pletivech oproti aromatickým cytokininům. Dále pak byly o izoprenoidních cytokininech hlubší znalosti, především co se týče jejich biosyntézy a metabolismu. Navíc se poměrně dlouhou dobu myslelo, že aromatické cytokininy se přirozeně v rostlinách nevyskytují (Van Staden and Crouch, 1996). Na druhou stranu aromatické cytokininy (konkrétně topoliny) mají na rozdíl od izoprenoidních vyšší fyziologickou stabilitu *in vivo*, která je způsobena významně vyšší rezistencí k oxidativní degradaci (Galuszka et al., 2007). Kromě toho jsou aromatické cytokininy aktivní při nižších koncentracích než izoprenoidní, a také mnohou podstoupit O-glukosylaci, během které vznikají jejich zásobní formy (Doležal and Strnad, 2017). Na základě mnoha dosavadních pozorování lze shrnout, že izoprenoidní cytokininy mají lepší vliv na růstové procesy spojené s buněčným dělením, zatímco aromatické cytokininy mají lepší vliv na vývojové procesy, především ty, které jsou spojeny s morfogenezí a stárnutím (Holub et al., 1998).

#### 4.6.1 Aromatické cytokininy

První izolace a identifikace přirozeně se vyskytujícího aromatického cytokininu, 6-(2-hydroxybenzyl-amino)-9-β-D-ribofuranosylpurinu, byla provedena na počátku 70. let minulého století z listů topolu (*Populus robusta*) (Horgan et al., 1975). Později byl izolován další aromatický cytokinin, méně aktivní hydroxylovaný derivát BAP - *oT* (6-(2-hydroxybenzylamino)purin) (Strnad, 1997). Ještě později byl poprvé izolován další aromatický cytokinin, vysoce aktivní hydroxylovaný derivát BAP - *mT* (6-(3-hydroxybenzylamino)purin), který byl popsán týmem v čele s profesorem Miroslavem Strnadem (Univerzita Palackého v Olomouci). Tato sloučenina byla poprvé izolována ze zralých listů topolu (*Populus × canadensis*), odtud název *meta*-topolin (Strnad et al., 1997). Později byly objeveny 4 další metoxy deriváty topolinů: *orto*-metoxytopolin (*MeoT*, 6-(2-metoxybenzylamino)purin); *meta*-metoxytopolin (*MemT*, 6-(3-metoxybenzylamino)purin) a jejich 9-β-D-ribofuranosyl deriváty- *meta*-metoxytopolin ribosid (*MemTR*) a *orto*-metoxytopolin ribosid (*MeoTR*). Tyto deriváty byly izolovány z *Arabidopsis thaliana* a *Populus × canadensis* (Tarkowska et al., 2003).

Předmětem této práce bylo sledování vlivu záměny BAP za *mT* během proliferace na vybrané charakteristiky embryogenní kultury v proliferaci a maturaci během procesu somatické embryogeneze u smrku ztepilého. V dalších částech literárního přehledu se proto věnují především těmto dvěma aromatickým cytokininům.

Především díky své efektivitě a finanční dostupnosti je BAP nejčastěji používaný aromatický cytokinin v mikropřepagační praxi (Strnad, 1997), nicméně u některých rostlinných druhů se vyskytují určité problémy spojené s jeho použitím. Jedním z hlavních problémů je, že BAP inhibuje tvorbu kořenů. BAP je konvertován ve stabilní metabolit N<sup>6</sup>-benzylaminopurin-9-glukosid ([9G]BAP), který se hromadí v bazální části rostliny, a tím inhibuje zakořeňování (Werbrouck et al., 1996; Werbrouck et al., 1995). Další problém je to, že u některých rostlinných druhů způsobuje BAP hyperhydricitu (Bairu et al., 2007; Montalban et al., 2011). Hyperhydrické explantáty špatně zakořeňují, jsou náchylnější k infekcím, vykazují nižší míru přežití při přenosu do nesterilních podmínek a vyskytují se u nich různé fyziologické abnormality jako např. výhony s nekrotizací špiček (Amoo et al., 2011). Právě kvůli výše zmíněným problémům existují studie hledající alternativy k použití BAP. V tuto chvíli se postupně dostává větší pozornosti hydroxylovaným derivátům BAP, topolinům (především vysoce aktivnímu *mT*). Topoliny se od BAP liší přítomností hydroxylové skupiny na benzenovém jádře postranního řetězce, studovaný *mT* má hydroxylovou skupinu v poloze meta (viz Obrázek 1).



**Obrázek 1.** Porovnání strukturního chemického vzorce 6-benzylaminopurinu (BAP) a *meta*-topolinu (*mT*) (převzato z Werbrouck et al., 1996)

*mT*, případně jeho deriváty, jsou považovány v mnoha případech za vhodnou či lepší variantu BAP-např. *mT* zlepšuje množení a kvalitu výhonů (např. u *Spathiphyllum floribundum*, Werbrouck et al., 1996), zpomaluje stárnutí (např. u *Pelargonium*, Wojtania, 2010), dále má pozitivní vliv na obsah fotosyntetických pigmentů a na regulaci aktivity antioxidantních enzymů (např. u *Corylus colurna*, Gentile et al., 2017). Dále *mT* potlačuje či redukuje některé fyziologické problémy, které se vyskytují při použití BAP, jako např. abnormality u vytvořených výhonů (např. u *Barleria greenii*, Amoo et al., 2011), snížení zakořeňovací kapacity či negativní efekt během aklimatizace při přenosu do nesterilních podmínek (např. u *Spathiphyllum floribundum*, Werbrouck et al., 1996). Bylo by ovšem na místě zdůraznit, že efekt *mT* není univerzální pro všechny rostlinné druhy (viz následující kapitoly) (Aremu et al., 2012a).

#### 4.6.1.1 Vliv BAP a *mT* na množení, případně kvalitu výhonů

Proces množení výhonů je významně ovlivněn typem a koncentrací cytokininů, protože právě cytokininy podmiňují proces buněčného dělení (Howell et al., 2003). Jelikož předmětem této práce je sledování vlivu záměny BAP za *mT* na proces somatické embryogeneze u smrku ztepilého, v každé kapitole v první řadě uvádím studie, které sledovaly vliv BAP a *mT* u jehličnanů.

Během regenerace u *Pinus pinea* bylo zjištěno, že procento indukovaných základů prýtů bylo signifikantně vyšší při použití 25  $\mu\text{M}$  *mT* v porovnání s 50  $\mu\text{M}$  BAP. Na druhou stranu procento přežití vytvořených základů prýtů bylo nepatrně vyšší po 2 měsících pěstování v podmínkách *in vitro* na médiu s BAP než na médiu s odpovídající koncentrací *mT* (Cortizo et al., 2009). V jiné studii se během regenerace *in vitro* u *Pinus sylvestris* vyvíjelo nejvíce pupenů na médiu s 25  $\mu\text{M}$  *mT* a 25  $\mu\text{M}$  BAP, mezi variantami nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl (De Diego et al., 2010). Dále bylo pozorováno, že explantáty zygotických embryí *Pinus pinaster* kultivované na médiu s přídatkem 2,2  $\mu\text{M}$  *mT* vykazovaly největší množství výhonů na explantát v porovnání s 2,2 a 4,4  $\mu\text{M}$  BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  *mT*, nicméně statisticky významný rozdíl byl zde pouze ve srovnání s 4,4  $\mu\text{M}$  *mT* a 4,4  $\mu\text{M}$  BAP (De Diego et al., 2011). Další studie sledovala vliv BAP a *mT* na tvorbu výhonů ze zygotického embrya u *Pinus radiata*. Během indukce bylo pozorováno největší množství vytvořených výhonů na zygotické embryo při aplikaci 4,4 a 10  $\mu\text{M}$  BAP, nicméně srovnatelné množství výhonů bylo pozorováno při aplikaci 1  $\mu\text{M}$  *mT* (Montalban et al., 2011). Na základě prostudované literatury je zřejmé, že velký vliv při porovnání BAP a *mT* na množení výhonů má koncentrace použitého cytokininu. Nicméně si myslím, že zde není pozorovatelný jednoznačný či statisticky významný trend ve prospěch jednoho z uvedených cytokininů na množení či kvalitu výhonů u jehličnanů.

Další studie sledující vliv BAP a *mT* během mikropropagace, které zde uvádím, se již netýkají jehličnanů. V první řadě uvádím studii, která porovnávala vliv BAP a *mT* na klíčení somatických embryí (SE) u *Carica papaya*. Při aplikaci 10  $\mu\text{M}$  *mT* a 1,8  $\mu\text{M}$  BAP vyklíčilo podobné procento SE (44 % v případě *mT* a 40 % v případě BAP). S případným zvýšením koncentrace BAP či *mT* v médiu docházelo k postupnému snižování počtu SE, která vyklíčila (Solorzano-Cascante et al., 2018). Z této studie je jasné, že vliv BAP a *mT* na klíčení SE velmi závisí na koncentraci použitého cytokininu.

Dále bylo u *Corylus colurna* zjištěno větší množství výhonů *in vitro* při aplikaci 4,1 a 8,2  $\mu\text{M}$  *mT* než při aplikaci odpovídající koncentrace BAP. Kromě toho výhony rostoucí v přítomnosti *mT* byly silnější a delší, což bylo efektivnější pro využití při mikroroubování s *Corylus avellana*, protože silnější výhony měly lepší kontakt s roubem, tudíž sloužily jako lepší podnož (Gentile et al., 2017). V další studii byl pozorován větší počet výhonů u dvou ze čtyř kultivarů *Corylus avellana* („Carrello“ a „Panottara“) v případě ošetření 8,2  $\mu\text{M}$  *mT* a nebyly pozorovány žádné hyperhydrické výhony. U dvou zbývajících kultivarů *Corylus avellana* („Minnulara“ a „Ghihara“) byl pozorován větší počet výhonů v případě ošetření 6,6  $\mu\text{M}$  BAP, nicméně 20 % vzniklých výhonů bylo hyperhydrických (Sgueglia et al., 2019). Během regenerace *in vitro* bylo často pozorováno efektivnější množení (větší počet a délka výhonů) a lepší kvalita

výhonů při aplikaci *mT* než při aplikaci BAP i u dalších rostlinných druhů, např. u *Pterocarpus marsupium* (Ahmad and Anis, 2019), dále u *Tecoma stans* (Hussain et al., 2019) a u *Syzygium cumini* (Naaz et al., 2019). Konkrétně největší počet a délka výhonů byly zaznamenány při koncentraci 7,5  $\mu\text{M}$  *mT* u *Pterocarpus marsupium* (Ahmad and Anis, 2019) a u *Tecoma stans* (Hussain et al., 2019). U *Syzygium cumini* byla pozorována maximální regenerace výhonů (v 90 % případů, s největším průměrným počtem a délkou) při aplikaci 5  $\mu\text{M}$  *mT* (Naaz et al., 2019). Podobně autoři jiné studie zaznamenali větší množství výhonů během regenerace *in vitro* u *Eriocephalus africanus* při ošetření *mT*, konkrétně největší množství při ošetření 1 a 5  $\mu\text{M}$  *mT* (Madzikane-Mlungwana et al., 2017) než při ošetření odpovídající koncentrací BAP. Podobně byl pozorovaný větší počet vytvořených výhonů při ošetření *mT* u *Zantedeschia albomaculata* (Chang et al., 2003), *Aloe polyphylla* (Bairu et al., 2007), *Aloe arborescens* (Amoo et al., 2012), *Huernia hystrix* (Amoo and Van Staden, 2013), *Ulmus glabra* (Mala et al., 2013) než při ošetření BAP. Obdobně tomu bylo i ve studii Wojtania (2010), kdy během mikropropagace měla aplikace *mT* u *Pelargonium* pozitivní vliv na počet a kvalitu vznikajících výhonů (v případě *mT* nebyly pozorovány vitrifikované výhony) v porovnání s BAP. V případě BAP se tvořilo signifikantně méně výhonů než při použití *mT* a docházelo k poklesu v kvalitě výhonů, které byly velmi často vitrifikované, deformované, měly tendenci hnědnout a často kalusovatět (Wojtania, 2010). Stejná situace byla zaznamenána u *Musa*, kdy bylo při použití *mT* během indukce pozorováno větší množství základů prýtlů než při použití BAP (Escalona et al., 2003) a také později v dalších dvou studiích autoři zaznamenali větší množství vytvořených výhonů při použití *mT* (Aremu et al., 2012c; Bairu et al., 2008), nicméně ve druhé uvedené studii byly pozorovány nejdelší výhony při aplikaci 10  $\mu\text{M}$  BAP (Aremu et al., 2012c).

Na druhou stranu existují i studie, které uvádějí naopak lepší efekt BAP na množení výhonů (více výhonů na explantát) v porovnání s *mT*, např. u *Sorbus torminalis* (Mala et al., 2009) a u *Citrus* (Niedz and Evens, 2010). U *Prunus domestica* a *Prunus insititia* bylo také pozorováno více výhonů při aplikaci BAP, ale na druhou stranu aplikace *mT* v tomto případě pozitivně ovlivnila následující růst a kvalitu výhonů (Gentile et al., 2014). Také Werbrouck et al. (1996) ve své studii u *Spathiphyllum floribundum* pozorovali větší množství výhonů na médiu s 20  $\mu\text{M}$  BAP v porovnání s 5, 10, 20 a 40  $\mu\text{M}$  *mT* a se snižující se koncentrací *mT* se snižoval počet vytvořených výhonů. Nicméně v případě 20  $\mu\text{M}$ , respektive 40  $\mu\text{M}$  *mT* byly výhony signifikantně větší a zelenější než v případě 20  $\mu\text{M}$  BAP (Werbrouck et al., 1996).

#### 4.6.1.2 Vliv BAP a *mT* na zakořeňování a aklimatizaci při přenosu do podmínek *ex vitro*

Chybějící kořeny nebo jejich nedostatečné množství je obecně rozsáhlý problém vyskytující se během mikropropagace. Existuje pozitivní korelace mezi dostatečným množstvím a kvalitou kořenů a následnou schopností rostlin se rychleji a lépe aklimatizovat při přenosu do nesterilních podmínek (podmínek *ex vitro*) (Werbrouck et al., 1996). Následný přenos do nesterilních podmínek je důležitý z hlediska použití a rozšíření *in vitro* technik v praxi. Při zakořeňování lze rozlišit efekt na vlastní zakládání kořenů v podmínkách *in vitro* a zakořeňování po přenosu do podmínek *ex vitro*.



Explantáty zygotických embryí (během organogeneze/regenerace *de novo*) *Pinus pinaster* kultivované na médiu s přidavkem BAP vykazovaly větší procento zakořenění než na médiu s přidavkem *mT*. Nicméně u explantátů, které zakořenily na médiu s přidavkem *mT*, následně přežilo větší procento rostlin (až 90 %) přenos do podmínek *ex vitro* než u explantátů, které zakořenily na médiu s BAP (De Diego et al., 2011).

Na druhou stranu u *Spathiphyllum floribundum* byla v podmínkách *in vitro* při aplikaci 20  $\mu\text{M}$  BAP pozorována inhibice vzniku kořenů, v případě 5 a 10  $\mu\text{M}$  *mT* se kořeny vytvořily asi v 50 % případů. V nesterilních podmínkách bylo pozorováno lepší zakořeňování (tvořilo se více delších kořenů) a lepší aklimatizace u rostlin, které byly pěstovány na médiu s 10, 20, 40  $\mu\text{M}$  *mT* než na médiu s odpovídající koncentrací BAP. V obou variantách se se zvyšující se koncentrací aplikovaného cytokininu snižovala délka kořenů a jejich počet. Autoři vysvětlují tento jev tím, že volná hydroxylová skupina na benzenovém kruhu *mT* může být podrobena glukosylaci. Hlavní vznikající metabolit *mT* ((OG)[9R]*mT* = (N<sup>6</sup>-(3-O- $\beta$ -D-glukopyranosyl) benzylaminopurin-9-ribosid)) je méně stabilní a rychleji degradován  $\beta$ -glukozidázou než metabolit BAP ([9G]BAP). Z toho vyplývá, že metabolit *mT* neinhibuje zakořeňování, protože se nehromadí v bazální části rostliny (viz kapitola 4.6.1) (Werbrouck et al., 1996).

Během mikropropagace bylo často pozorováno efektivnější zakořenění (větší počet a délka kořenů) a lepší aklimatizace při přenosu do nesterilních podmínek při aplikaci *mT* než při aplikaci BAP i u dalších rostlinných druhů. Např. u *Corylus colurna* bylo pozorováno signifikantně větší procento rostlin, které zakořenily v podmínkách *in vitro* a následně se úspěšně aklimatizovaly při přenosu do nesterilních podmínek, při použití 4,1  $\mu\text{M}$  *mT* a 8,2  $\mu\text{M}$  *mT* než při použití odpovídajících koncentrací BAP. (Gentile et al., 2017). Podobná situace týkající se většího počtu indukovaných kořenů u kultur, které byly pěstovány na médiu s 5  $\mu\text{M}$  *mT*, byla pozorována u *Syzygium cumini*. Také největší procento rostlin (95 %), které se úspěšně aklimatizovaly, bylo pozorováno na médiu s *mT* (Naaz et al., 2019). Autoři jiné studie pozorovali větší množství a délku kořenů vytvořených v podmínkách *in vitro* a větší míru přežití (až 80 %) při přenosu do podmínek *ex vitro* během regenerace u *Pterocarpus marsupium* při aplikaci *mT* než při aplikaci odpovídající koncentrace BAP (Ahmad and Anis, 2019). Dále rostliny *Aloe polyphylla*, které byly v podmínkách *in vitro* pěstované na médiu s 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  *mT*, byly úspěšněji aklimatizovány (v podmínkách *ex vitro* rostly rychleji a lépe zakořeňovaly) než ty, které byly pěstované na médiu s BAP (Bairu et al., 2007). Použití topolinů (*mT* a jeho derivátů) u *Musa* zajišťovalo ve většině případů snadnější zakořeňování v podmínkách *in vitro* v porovnání s BAP, největší množství nejdelších kořenů bylo pozorováno při aplikaci 10  $\mu\text{M}$  *mT*. Ovšem se zvyšující se použitou koncentrací (10, 20, 30  $\mu\text{M}$ ) cytokininů (BAP, *mT* a jeho derivátů) se zesiloval jejich inhibiční efekt na tvorbu kořenů (Aremu et al., 2012c). Podobný inhibiční efekt se zvyšující se použitou koncentrací cytokininů (BAP, *mT*) byl pozorován u *Musa* již dříve (Escalona et al., 2003; Bairu et al., 2008) a také u *Uniola paniculata* (Valero-Aracama et al., 2010).

#### 4.6.1.3 Vliv BAP a *mT* na různé fyziologické abnormality, hyperhydricitu

Mezi další pozitivní efekty, které jsou spojovány s použitím *mT*, patří redukce abnormalit vyskytujících se u explantátů či rostlin pěstovaných v podmínkách *in vitro*, dále pak potlačení či redukce hyperhydricity. Hyperhydricita je morfologická a fyziologická porucha, která je často spojena s použitím techniky *in vitro*, a brání tak jejímu širšímu rozšíření (Debergh et al., 1992). Z prostudované literatury je zřejmé, že typ a koncentrace cytokininu souvisí s případnou hyperhydricitou.

Co se týče hyperhydricity u jehličnanů, tak během indukce výhonů ze zygotického embrya u *Pinus radiata* bylo pozorováno větší množství hyperhydrických explantátů při aplikaci 10 a 40  $\mu\text{M}$  BAP (až 50 %) v porovnání s aplikací *mT* (Montalban et al., 2011). Kromě toho byla hyperhydricita pozorována i u jiných rostlinných druhů během mikropropagace. Např. u *Aloe polyphylla* rostl při ošetření BAP počet hyperhydrických výhonů společně se vzrůstající koncentrací aplikovaného cytokininu, oproti tomu při ošetření *mT* nebyly pozorovány žádné hyperhydrické výhony (Bairu et al., 2007). Také jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, tak u dvou kultivarů *Corylus avellana* („Minnulara“ a „Ghihara“) byla pozorována hyperhydricita u 20 % vzniklých výhonů při ošetření 6,6  $\mu\text{M}$  BAP (Sgueglia et al., 2019).

Co se týče abnormalit, tak během regenerace *in vitro* u *Barleria greenii* byl pozorován větší index abnormality (tj. poměr hyperhydrických výhonů a výhonů s nekrózou špiček ku normálním výhonům) při ošetření 1, 3, 5, 7  $\mu\text{M}$  BAP než při ošetření odpovídající koncentrací *mT* (Amoo et al., 2011). Dále během množení výhonů *Corylus colurna* byly pozorované morfologické abnormality (nekróza špiček vytvořených výhonů, hyperhydrické výhony) ve 40 % případů při použití 4,1 a 8,2  $\mu\text{M}$  BAP, na druhou stranu při použití odpovídající koncentrace *mT* nebyly pozorovány žádné morfologické abnormality. Kromě abnormalit výhonů byly pozorovány i morfologické abnormality kořenů (nekróza kořenových špiček) (v 60 % případů) při použití 4,1 a 8,2  $\mu\text{M}$  BAP, ale při použití *mT* nebyly pozorovány žádné abnormality na kořenech (Gentile et al., 2017).

Kromě výše uvedených situací se *mT* jeví jako lepší alternativa k běžně používanému BAP v mnoha dalších ohledech během mikropropagace, např. tím, že zpomaluje stárnutí rostlin (např. u *Pelargonium*, Wojtania, 2010), dále má *mT* pozitivní vliv na obsah fotosyntetických pigmentů, na regulaci aktivity antioxidantních enzymů (např. u *Corylus colurna*, Gentile et al., 2017) a mnoho dalších. Nicméně u těchto procesů mi nejsou známy studie sledující vliv BAP a *mT* týkající se jehličnanů, z tohoto důvodu je zde zmiňuji pouze okrajově.

Na základě prostudované literatury je zřejmé, že se *mT* jeví v mnoha ohledech jako lepší alternativa k BAP. Nicméně tento vliv není univerzální a velice závisí na tom, o jaký proces se jedná a také na koncentraci aplikovaného cytokininu. Mně v tuto chvíli nejsou známy žádné studie či informace, které by se sledovaly či porovnávaly vliv BAP a *mT* na proces somatické embryogeneze u jehličnanů.

## 5 Materiál a metody

Kultivace embryogenní kultury a následné experimenty byly provedeny na Katedře experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty UK, s výjimkou stanovení obsahu vybraných fytohormonů, které bylo provedeno ve spolupráci s Laboratoří hormonálních regulací u rostlin (ÚEB AV ČR, Dr. Motyka).

### 5.1 Rostlinný materiál

Veškeré experimenty mé diplomové práce byly provedeny na embryogenní kultuře smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.). Konkrétně se jednalo o linii C, která byla odvozena v našem týmu Mgr. Lenkou Hruškovou (PřF UK) ve spolupráci v VÚLHM Strnady. Tato linie vykazuje dobrou rezpozivitu k působení ABA a dobrou embryogenní kapacitu, srovnatelnou s liniemi, které byly týmem dlouhodobě používány a jsou považované za modelové (AFO541, C110, např. Hudec et al., 2016). Linie C byla vedena během proliferace ve 2 sub-liniích lišících se aplikovaným cytokininem: ve variantě s 6-benzylaminopurinem (BAP) a ve variantě s *meta*-topolinem (*mT*).

### 5.2 Kultivace

#### 5.2.1 Proliferace (Udržování/množení embryogenní kultury)

Embryogenní kulturu jsem pěstovala ve sterilním prostředí (v podmínkách *in vitro*) na proliferačním GD médiu (Gupta and Durzan, 1986; složení viz Tabulka 1), v plastových Petriho miskách (průměr 9 cm) při 25 °C ve tmě v kultivačním boxu. Subkultivační interval byl jeden týden a kultury jsem přesazovala za aseptických podmínek v laminárním flow-boxu.

#### 5.2.2 Maturace (Zrání embryogenní kultury)

Maturace probíhala 6-7 týdnů (dle konkrétního experimentu, viz níže) v krabičkách Magenta (typ GA-7-3, Sigma-Aldrich) při 25 °C ve tmě v kultivačním boxu, subkultivační interval byl jeden týden. Na připravené maturační GD médium jsem vysazovala 9 kousků (kupek) embryonální suspenzorové hmoty (ESM; hmotnost 1 kousku ESM cca 0,06-0,08 g). Vysazovala jsem vždy proliferující kulturu ze 7. dne subkultivačního intervalu.

#### 5.2.3 Složení a příprava kultivačních médií

##### 5.2.3.1 Proliferační médium

Embryogenní kulturu jsem pěstovala na proliferačním GD médiu (Gupta and Durzan, 1986) (složení viz Tabulka 1). Pro přípravu GD média jsem smíchala uvedené množství zásobních roztoků makroprvků, mikroprvků, železa (vše uchováváno v lednici), organických doplňků (uchováváno v mrazáku), z organických doplňků jsem přímo dovážela L-glutamin, kasein-hydrolyzát a myo-inositol. Poté jsem do média přidala růstové regulátory (taktéž připraveny jako zásobní roztoky

uchovávané v lednici, v koncentraci 1 mg/ml), konkrétně kinetin (finální koncentrace v médiu 0,43 mg/l tj. 2  $\mu$ M) a 2,4- dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D) (1,1 mg/l tj. 5  $\mu$ M). Jelikož byla embryogenní linie vedena ve 2 sub-liniích (BAP, *mT*), do médií jsem dále přidala BAP (0,43 mg/l tj. 1,9  $\mu$ M) nebo *mT* (0,43 mg/l tj. 1,8  $\mu$ M). Poté jsem do média přidala sacharózu (30 g/l), doplnila destilovanou vodou na přesný objem a upravila pH na hodnotu 5,8. GD médium bylo zpevněno Phytagelem (4 g/l; Sigma-Aldrich) a sterilizováno autoklávováním po dobu 20 min, při 121 °C a tlaku 0,144 MPa. Po autoklávování jsem ještě teplé, dobře promíchané médium rozlila do sterilních Petriho misek ve flow-boxu (cca 25 ml média do jedné Petriho misky). Misky byly sterilně zabaleny a uchovány ve tmě do jejich použití (max. 3 týdny) při pokojové teplotě.

**Tabulka 1** - Složení proliferačního GD média

Složka	Komponenty složky	Koncentrace v zásobním roztoku (mg/l)	Finální koncentrace v médiu (mg/l)
A – makroprvky (50 ml na 1 l média)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5 500	275
	KNO <sub>3</sub>	46 800	2 340
	CaCl <sub>2</sub>	3 320	166
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3 700	185
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 700	85
A – mikroprvky (10 ml na 1 l média)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	310	3,1
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	845	8,45
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	491,5	4,915
	KI	41,5	0,415
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	12,5	0,125
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1,25	0,0125
	CoCl <sub>2</sub>	0,68	0,0068
A – železo (10 ml na 1 l média)	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1400	14
	Na <sub>2</sub> EDTA	1900	19
B – organické doplňky (2,5 ml na 1 l média)	Glycin	400	1
	kyselina nikotinová	100	0,25
	pyridoxin·HCl	100	0,25
	thiamin·HCl	200	0,5
C – růstové regulátory (přidáno množství finální koncentrace)	2,4-D	1	1,1
	kinetin	1	0,43
	BAP/ <i>mT</i>	1	0,43
Dováženo přímo při přípravě média	L-glutamin		450
	kasein-hydrolyzát		500
	myo-inositol		1000

#### 5.2.3.2 Maturační médium

Složení maturačního média je téměř totožné jako složení proliferačního média (složení viz Tabulka 1), pouze s několika rozdíly. Navíc jsem do maturačního média přidala polyethylenglykol 4000 (PEG 4000) (35 g/l) a MES pufr (300 mg/l). Do maturačního média jsem nepřidávala žádné růstové regulátory používané během proliferace, ale pouze kyselinu abscisovou (ABA, (±)-Abscisic acid, katalogové číslo- A1049, Sigma-Aldrich) v koncentraci 5,3 mg/l (20  $\mu$ M). Zásobní roztok ABA jsem připravila rozpuštěním 7,4 mg ABA v několika kapkách 1M KOH, a poté jsem doplnila destilovanou vodou na objem 14 ml. Roztok ABA jsem přefiltrovala přes membránový filtr do sterilní mikrozkuhavky a přidala jsem ho až do téměř vychladlého sterilního média (cca 45 °C) pomocí jednorázové sterilní pipety (10 ml na 1 l média). Nakonec jsem médium rozlila do sterilních krabiček Magenta ve flow-boxu (cca 30 ml média do jedné krabičky). Krabičky byly uchovány ve tmě při pokojové teplotě do jejich použití (max. 7 dní).

### 5.3 Provedené analýzy

#### 5.3.1 Počet zralých SE v 5. a 6. týdnu maturace

V 5. a 6. týdnu maturace jsem počítala počet zralých SE v kotyledonárním stádiu bez známek abnormalit, vyvinutých na kousku (jednotce, kupce) vysazované ESM. Celkem se v jedné krabičce nacházelo 9 kousků ESM a pro každou variantu byly v každém z týdnů hodnoceny 4 krabičky Magenta.

#### 5.3.2 Výtěžnost

Před vysazením ESM na maturační médium jsem zvažila čerstvou hmotnost vysazované ESM v jednotlivých krabičkách Magenta. V 7. týdnu maturace jsem zjistila počet zralých SE v kotyledonárním stádiu bez známek abnormalit v každé krabičce Magenta. Počet embryí jsem následně vztáhla na 1 g výchozí čerstvé hmotnosti ESM.

#### 5.3.3 Analýza obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu

##### 5.3.3.1 Odběr materiálu

Vzorky jsem odebírala vždy na konci týdenního subkultivačního intervalu, a to jednou na počátku experimentu (odběr tedy odpovídá stavu kultury, která byla vysazována na maturační médium) a dále pak každý týden maturace (6 týdnů). Celkem jsem každý týden pro každou variantu odebrala 6 vzorků (biologických opakování). V proliferaci a do konce 4. týdne maturace jsem odebírala ESM jako celek, v 5. a 6. týdnu maturace jsem izolovala jednotlivá embrya. Vzorky jsem odebírala do předem zvážených a označených mikrozkuhovek s propíchnutým víčkem. Po zvážení plné mikrozkuhavky na analytických váhách jsem ji ihned vložila do termonádoby s tekutým dusíkem. Takto odebrané vzorky byly uchovány při - 80 °C a připraveny pro další zpracování.

### 5.3.3.2 Příprava vzorků pro analýzu nestrukturních sacharidů

V prvním kroku jsem vzorky vysušila lyofilizací (Lyovac GT 2, Finn-Aqua, cca 18 hodin), ihned poté jsem na analytických váhách zjistila hmotnost sušiny. Ke každému vzorku jsem přidala 0,5 ml 80 % metanolu a poté jsem nechala vzorky inkubovat v termobločku (Grant-Boeckel BBD) po dobu 15 min při teplotě 75 °C. Metanol jsem nechala vakuově odpařit (SpeedVac Plus SC110A, Savant; program V-AL, 3 hodiny a 45 °C). Poté jsem ke vzorkům přidala odpovídající množství ultračisté Mili Q H<sub>2</sub>O podle hmotnosti vzorků (viz Tabulka 2).

**Tabulka 2** - Množství Mili Q H<sub>2</sub>O k extrakci rozpustných sacharidů v závislosti na suché hmotnosti vzorků

Suchá hmotnost vzorku (mg)	Mili Q H <sub>2</sub> O (ml)
< 5	0,2
5 – 10	0,3
10 – 20	0,5
20 – 30	1
30 – 40	1,5
40 – 50	2

Následně jsem vzorky umístila na 15 min do ultrazvukové lázně (Julabo USR 05), poté jsem nechala vzorky odstředit pomocí centrifugy (Eppendorf Centrifuge 5415 D) na max. výkon (14 000x g) po dobu 10 min. Supernatant jsem přefiltrovala pomocí injekční stříkačky přes membránový filtr (Milley Milipore, velikost pórů 0,22 μm) do nově označené mikrozkušavky. Takto připravený vzorek byl až do měření uchováván při teplotě -20 °C.

### 5.3.3.3 Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů

Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů probíhalo pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) s refraktometrickou detekcí. Parametry měřicího systému byly následující: kolona Shodex Sugar SC1011 Pb<sup>2+</sup> (Shodex, Tokio, Japan), mobilní fáze – Mili Q H<sub>2</sub>O; rychlost průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min; teplota kolony 80 °C; objem injikovaného vzorku 10 μl nebo 20 μl podle velikosti nástřikové smyčky; isokratická pumpa SISw HPI-300 nebo Delta Chrom SDS 030; refraktometrická detekce (detektor Shodex RI-71); počítačový program CLARITY; kvantifikováno pomocí standardů (Sigma-Aldrich).

### 5.3.3.4 Výpočet pro stanovení obsahu sacharidů

Obsah sacharidu v sušině =  $S_x / S_s * V_{H_2O} / DW$  (μg/mg)

S <sub>x</sub>	plocha peaku konkrétního sacharidu u konkrétního vzorku
S <sub>s</sub>	plocha peaku standardu (1 mg/ml) příslušného sacharidu
V <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	objem Mili Q H <sub>2</sub> O, která byla ke vzorku přidána (ml)
DW	suchá hmotnost vzorku (mg)

#### 5.3.3.5 Příprava vzorků pro stanovení obsahu škrobu

K přípravě vzorků pro analýzu škrobu jsem použila pelety uchované z analýzy rozpustných nestrukturních sacharidů. Nejdříve bylo nutné pelety promýt, aby došlo k odstranění zbytků rozpustných nestrukturních sacharidů. K peletům jsem přidala 1 ml ultračisté Mili Q H<sub>2</sub>O, vzorky jsem zvortexovala, a poté umístila na 15 min do ultrazvukové lázně, následně jsem vzorky centrifugovala 15 min na max. výkon (14 000x g), poté jsem pomocí injekční stříkačky odstranila supernatant. Pelety jsem stejným způsobem promývala ještě 3x. K promytým peletům jsem přidala 0,5 ml 0,1 M acetátového pufru (příprava acetátového pufru: do roztoku 200 ml 0,2 M octanu sodného jsem umístila pH metr a přikapávala jsem roztok 0,2 M kyseliny chlorovodíkové do dosažení pH 4,5). Poté jsem mikrozkuhavky se vzorky nechala zklávkovat (20 min, při 121 °C a tlaku 0,144 MPa,). Po vychladnutí vzorků jsem přidala 100 µl enzymatického roztoku (30 mg amyloglukosidázy (Fluka Sigma-Aldrich, 60U) a 30 mg α-amylázy (Fluka Sigma-Aldrich, 30U) rozpuštěno v 3 ml 0,1 M acetátového pufru (pH 4,5) - uvedené množství vystačí na 24 vzorků). Vzorky jsem nechala inkubovat v termobločku přes noc při 40 °C. Další den jsem inaktivovala enzymy zvýšením teploty na 95 °C po dobu 5 min. Poté jsem vzorky vysušila pomocí vakuové odparky za sníženého tlaku (program V-AQ, cca 3 hodiny, 45 °C). Poté jsem ke vzorkům přidala odpovídající množství ultračisté Mili Q H<sub>2</sub>O (viz Tabulka 2), následně jsem vzorky na 15 min umístila do ultrazvukové lázně a poté jsem je 10 min centrifugovala na max. výkon (14 000x g). Supernatant jsem přefiltrovala přes membránový filtr do nově označené mikrozkuhavky. Takto připravený vzorek byl až do měření uchováván při teplotě -20 °C.

#### 5.3.3.6 Stanovení obsahu škrobu

Stanovení množství glukózy vzniklé enzymatickým rozkladem škrobu probíhalo pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) s refraktometrickou detekcí (parametry viz kapitola 5.3.3.3) (výpočet množství glukózy viz kapitola 5.3.3.4).

### 5.3.4 Anatomická analýza

#### 5.3.4.1 Odběr materiálu

Vzorky jsem odebrala vždy na konci subkultivačního intervalu, a to jednou na počátku experimentu (odběr tedy odpovídá stavu kultury, která byla vysazována na maturační médium) a dále pak každý týden maturace (7 týdnů). V proliferaci a do konce 4. týdne maturace jsem odebrala ESM jako celek, v 5., 6. a 7. týdnu maturace jsem izolovala jednotlivá embrya. Celkem jsem každý týden pro každou variantu odebrala 3 vzorky do připravené fixáže, kterou byla 50 % FAA (formaldehyd/kyselina octová/ 50 % etanol v poměru 1 : 1 : 18). Všechny 3 vzorky pro stejnou variantu a konkrétní týden jsem uchovala ve stejné předem označené lékovce.

#### 5.3.4.2 Příprava trvalých preparátů

Pro přípravu trvalých preparátů jsem vzorky nejprve promyla v 50 % etanolu (do této doby jsem měla vzorky uloženy v 50 % FAA), poté jsem vzorky odvodnila pomocí vzestupné etanol-butanolové řady (viz Tabulka 3).

**Tabulka 3** – Vzestupná etanol-butanolová řada

	Množství vody	Množství etanolu	Množství butanolu
1.	45 %	30 %	25 %
2.	30 %	30 %	40 %
3.	20 %	25 %	55 %
4.	10 %	20 %	70 %
5.	-	15 %	85 %
6.	-	-	100 %
7.	-	-	100 %

Poté jsem vzorky po několik dnů pomalu postupně (v několika krocích, každý krok vždy se vzrůstající čistotou) infiltrovala parafínem a nakonec jsem je do parafínu zalila. Vzorky jsem poté připevnila na dřevěné bločky a následně jsem řezala 12  $\mu\text{m}$  silné řezy na rotačním mikrotomu (Leica RM 2155, Německo). Tyto řezy jsem přenesla na předem označené podložní sklíčko, na kterém jsem měla nanesenou tenkou vrstvu směsi glycerol : bílek (1 : 1) a dostatečné množství vody. Takto vytvořené preparáty jsem nechala cca 10 min narovnat na topné desce a nakonec jsem je nechala zaschnout při pokojové teplotě alespoň 48 hodin. Po zaschnutí jsem preparáty barvila dvoustupňovou procedurou (alcianová modř + pravá jádrová červeň, obě Sigma-Aldrich) (viz Tabulka 4). Obarvené preparáty jsem odvodnila, převedla do toluenu a zavírala krycím sklíčkem do umělé pryskyřice (Pertex-Histolab AB, Švédsko).

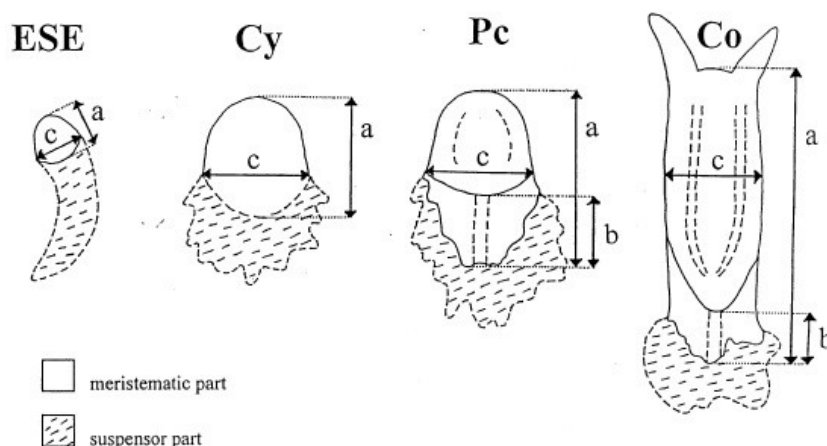
**Tabulka 4** - Postup barvení mikroskopických preparátů

1.	Odparafinování řezů: toluen I, II, III	3 min
2.	Zavodnění: sestupná etanolová řada (100 % (2x), 96 %, 70 %, 50 %, 30 % (v/v), voda)	3 min
3.	3 % kyselina octová (v/v)	1 min
4.	Alcianová modř (0,1 % (w/v) v 3 % kyselině octové (v/v))	20 min
5.	Oddiferencování přebytečného barviva ve vodě	3 min
6.	Pravá jádrová červeň (1 % (w/v) v 5 % vodném roztoku $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (w/v))	3-5 min
7.	Oddiferencování přebytečného barviva ve vodě (2x)	3 min
8.	Odvodnění: vzestupná etanolová řada (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 % (2x) (v/v))	3 min
9.	Promytí toluenem: toluen I, II, III	3 min



#### 5.3.4.3 Průběh a časování maturace a kvantitativní analýza struktur

Pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) jsem pozorovala nástup a průběh jednotlivých vývojových stádií SE pomocí trvalých anatomických preparátů vytvořených ze sériových řezů ESM (1. - 4. týden maturace) a izolovaných SE (5. - 7. týden maturace). Jedná se o zjednodušenou formu kategorizace vývoje pomocí semikvantitativního popisu, vývojová stádía jsem si určila na základě literatury (Svobodova et al., 1999, viz Obrázek 2). Dále jsem na předem kalibrovaném mikroskopu měřila délku a šířku meristematických oblastí zralých kotyledonárních embryí v 5., 6. a 7. týdnu maturace (viz Obrázek 2). Pro každý týden a každou variantu jsem změřila minimálně 3 zralá SE – ze sériových řezů jsem vybrala vždy jejich mediální řezy.



**Obrázek 2.** Vývojová stádía SE pro semikvantitativní popis a jejich délkové parametry. ESE-rané somatické embryo, Cy- cylindrické embryo, Pc- prekotyledonární embryo, Co- kotyledonární embryo. a- délka meristematické části embrya, b- délka kořenové čepičky, c- šířka meristematické části embrya. (převzato z Svobodova et al., 1999).

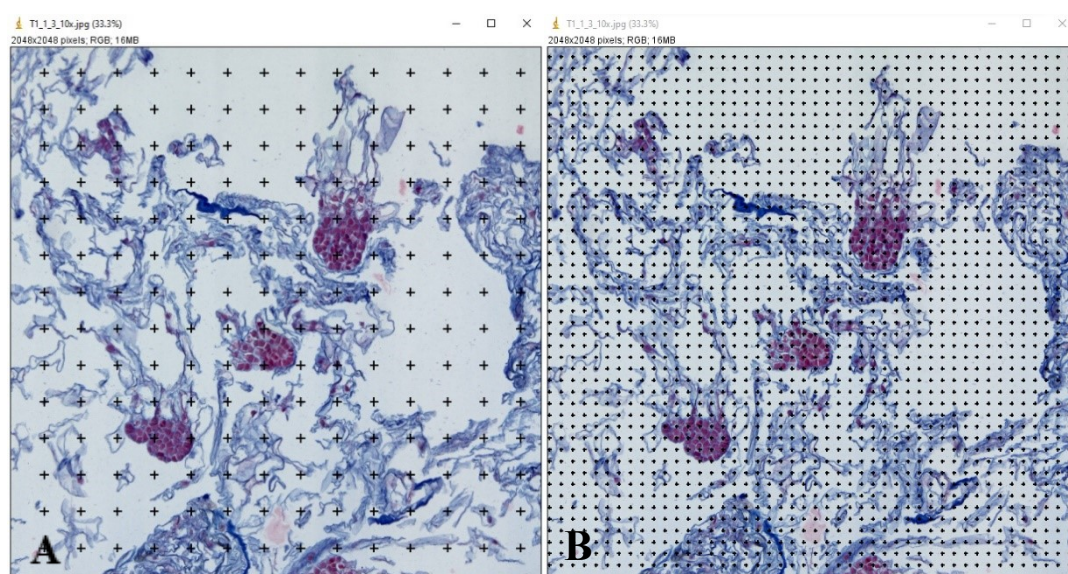
#### 5.3.4.4 Poměrné zastoupení meristematických oblastí

Na základě konzultace s Dr. Radochovou (Fyziologický ústav AV ČR) jsem k hodnocení podílu meristematických oblastí zvolila bodovou metodu pro stanovení velikosti plochy. Principem této metody je systematicky rovnoměrně náhodné přiložení pravidelné bodové mřížky na mikrofotografii řezu a počítání počtu zásahů do pozorované oblasti či struktury. Po vynásobení počtu zásahů plochou odpovídající jednomu bodu testovací mřížky jsem získala odhad velikosti plochy dané struktury, z této hodnoty jsem vypočítala podíl zastoupení jednotlivých typů struktur. Mikrofotografie pro tento typ analýzy byly pořízeny pod světelným mikroskopem (Nikon Eclipse 90i) při zvětšení 10x v proliferaci a při zvětšení 4x v 1. týdnu maturace, v programu NIS Elements (Nikon, Tokyo, Japan). Z proliferace a 1. týdne maturace jsem hodnotila 3 náhodně vybrané kousky ESM pro každou variantu. Z každého kousku ESM jsem hodnotila 5 řezů, které byly od sebe vzdáleny minimálně 100  $\mu\text{m}$ . Každý řez se skládal z cca 30-40 jednotlivých snímků v 1. týdnu maturace při zvětšení 4x a z cca 70-100 jednotlivých snímků v proliferaci při zvětšení 10x. Snímek řezu se automaticky skládal dohromady v programu NIS-Elements. Celkem jsem tedy hodnotila 60 složených snímků pro obě varianty v proliferaci a 1. týdnu maturace.

Bodová mřížka, kterou jsem použila pro změření poměrného zastoupení meristematických oblastí, je standardním nástrojem v programu FIJI (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Po důkladném prohlédnutí většího množství preparátů ke stanovení poměrného zastoupení jednotlivých struktur jsem si v rámci pletiva ustanovila 2 kategorie: 1. meristematické

oblasti (malé buňky s hustou cytoplazmou), 2. zbytková hmota (suspensorové buňky, neembryogenní buňky, mrtvá suspensorová hmota). Na základě konzultace jsem vyhodnotila, že detailnější rozdělení kategorií by v této embryogenní kultuře nemělo smysl, protože ostatní kategorie byly zastoupeny velmi ojediněle, respektive je nebylo možné s jistotou rozlišit. Linie C se v tomto ohledu liší od jiných, podobnými metodami studovaných embryogenních kultur (např. Kadlecová 2013, Gautier et al., 2018).

V programu FIJI jsem si pomocí nástroje Grid (Analyze→Tools→Grid) nadefinovala pravidelnou bodovou mřížku. Její hustotu jsem zvolila podle velikosti měřených struktur. Ideálně by mřížka měla být hustá tak, aby počet zásahů do vybraných struktur byl cca 100-200. Tudiž pro počítání celkové plochy řezu jsem zvolila řidší mřížku a naopak pro zjištění plochy meristematických oblastí mřížku hustší (viz Obrázek 3). Po vynásobení počtu zásahů plochou odpovídající jednomu bodu testovací mřížky jsem získala odhad velikosti plochy dané struktury, při odečtení velikosti plochy meristematických oblastí od celkového obsahu řezu jsem dostala velikost plochy zbytkové hmoty.



**Obrázek 3.** Příklad přiložení testovací bodové mřížky na dílčí snímek histologického řezu. **A.** Řidká mřížka pro zjištění celkové plochy řezu. **B.** Hustá mřížka pro zjištění plochy meristematických oblastí

### 5.3.5 Biochemické stanovení obsahu fenolických látek

Biochemické stanovení obsahu fenolických látek metodou Folin-Ciocalteu bylo provedeno dle optimalizované metodiky Singleton and Rossi (1965).

#### 5.3.5.1 Odběr materiálu

Vzorky jsem odebírala vždy na konci týdenního subkultivačního intervalu, a to jednou na počátku experimentu (odběr tedy odpovídá stavu kultury, která byla vysazována na maturační médium) a dále pak každý týden maturace (7 týdnů). V proliferaci a do konce 5. týdne maturace jsem odebírala ESM jako celek, v 6. a 7. týdnu maturace jsem izolovala jednotlivá embrya. Celkem jsem každý týden pro každou variantu odebrala 5 vzorků. Vzorky jsem odebrala do předem zvážených a

označených mikrozkušavek s propíchnutým víčkem. Po zvážení plné mikrozkušavky na analytických váhách jsem ji ihned vložila do termonádoby s tekutým dusíkem. Takto odebrané vzorky byly uchovávány při - 80 °C a připraveny pro další zpracování.

#### 5.3.5.2 Příprava vzorků

V prvním kroku jsem odebrané vzorky nechala při pokojové teplotě rozmrazit. Poté jsem vzorek přemístila do třecí misky, přidala jsem 1,5 ml 80 % metanolu a vzorek jsem homogenizovala. Zhomogenizovaný vzorek jsem vrátila zpět do mikrozkušavky a obsah jsem jehlou promíchala. Vzorky jsem inkubovala v termobločku při 55 °C po dobu 30 min. Poté jsem vzorky odstředila pomocí centrifugy po dobu 5 min při 14 000x g. Odebrala jsem supernatant do nové 5 ml mikrozkušavky. Ke zbylému peletu jsem přidala dalších 1,5 ml 80 % metanolu, usazený pelet jsem s metanolem promíchala. Další postup (inkubace, centrifugace, odebrání supernatantu) byl stejný jako při první extrakci, tento postup jsem zopakovala 2x, přičemž při posledním opakování jsem přidala pouze 1 ml 80 % metanolu. Až do spektrofotometrického stanovení byly takto zpracované metanolvé extrakty uchovány v lednici.

#### 5.3.5.3 Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno nejdříve 3. den po extrakci. Nejprve jsem odebrala z připraveného vzorku, který byl uchován v 5 ml mikrozkušavce v lednici, 1 ml do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Vzorky jsem centrifugovala po dobu 5 min při 14 000x g. Mezitím jsem si připravila skleněné zkumavky, do kterých jsem napipetovala 10 ml roztoku C (příprava roztoku C viz Tabulka 5). Poté jsem k roztoku C ve skleněné zkumavce přidala 0,5 ml odstředěného vzorku, promíchala jsem a nechala stát 10 min. Nakonec jsem do skleněné zkumavky přidala 0,2 ml Folin-Ciocalteu reagens (komerční roztok, Sigma-Aldrich), promíchala jsem a nechala stát 30 min.

**Tabulka 5** – Příprava roztoku C pro spektrofotometrické stanovení obsahu fenolických látek

roztok A	2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> v 0,4% NaOH
roztok B	0,5 % CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O v 1% KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> · 4H <sub>2</sub> O
roztok C	1 ml roztoku B v 50 ml roztoku A (nutno míchat čerstvě)

Spektrofotometrické stanovení absorbance jsem prováděla na spektrofotometru (Unicam Helios α) při vlnové délce 750 nm, délku měření jsem nastavila na 2 s. Do jednorázové plastové kyvety jsem napipetovala 1 ml připraveného vzorku ze skleněné zkumavky. Jako blank byl použit roztok C. Pro výpočet koncentrace fenolických látek byla použita rovnice lineární regresní přímky:  $x = (y - 0,0058) / 0,3885$ ;  $x$  = koncentrace fenolů v mg,  $y$  = absorbance). Rovnice byla vypočtena z kalibrační křivky kyseliny gallové.

### 5.3.6 Stanovení obsahu kyseliny askorbové

Stanovení obsahu redukované formy kyseliny askorbové (ASC) jsem provedla pomocí komerčně dodávaného kitu (Ascorbic Acid Assay Kit II- Sigma-Aldrich-viz Tabulka 6).

**Tabulka 6** – Ascorbic Acid Assay Kit II

<b>Obsah balení:</b>	<b>Použití, případně příprava:</b>
FRASC Buffer	Příprava vzorků, Master Reaction Mix
Ascorbic Acid Probe	Master Reaction Mix
Iron Chloride Solution	Master Reaction Mix
Ascorbic Oxidase	Vzorky s oxidázou, Rozpustit v 500 µl vody
Ascorbic Acid Standard, 20 µmole	Standardy, Rozpustit v 200 µl vody

#### 5.3.6.1 Odběr materiálu

Vzorky jsem odebrala vždy na konci týdenního subkultivačního intervalu, a to jednou na počátku experimentu (odběr tedy odpovídá stavu kultury, která byla vysazována na maturační médium) a dále pak každý týden maturace (6 týdnů). Nicméně stanovení obsahu kyseliny askorbové jsem provedla pouze v proliferaci, 1., 3. a 5. týdnu maturace. V proliferaci a do konce 4. týdne maturace jsem odebrala ESM jako celek, v 5. a 6. týdnu maturace jsem izolovala jednotlivá embrya. Celkem jsem každý týden pro každou variantu odebrala 4 vzorky, každý vzorek o hmotnosti cca 40 mg jsem navázila do předem označené mikrozkušavky s propíchnutým víčkem a ihned jsem ji vložila do termonádoby s tekutým dusíkem. Takto odebrané vzorky byly uchovány při - 80 °C a připraveny pro další zpracování.

#### 5.3.6.2 Příprava vzorků

V prvním kroku jsem odebrané vzorky nechala rozmrazit. Poté jsem ke každému vzorku přidala 160 µl roztoku označeného FRASC Buffer. Vzorky jsem ručně zhomogenizovala pomocí homogenizačního tloučku. Poté jsem vzorky centrifugovala při 13 000x g, 10 min, při 4 °C (Hettich Universal 32R). Z každého vzorku jsem odebrala 140 µl supernatantu do nové označené mikrozkušavky, doplnila jsem vodou na objem 400 µl (přidala jsem 260 µl vody). Takto připravené vzorky jsem až do měření uchovávala na ledu. Poté jsem si připravila Master Reaction Mix: smíchala jsem FRASC Buffer, Ascorbic Acid Probe a Iron Chloride Solution v poměru 8 : 1 : 1. Dále jsem si připravila Ascorbic Acid Standard: smíchala jsem 10 µl 100 mM předem připraveného roztoku (rozpuštěním Ascorbic Acid Standard s 200 µl vody, viz Tabulka 6) s 990 µl vody.

#### 5.3.6.3 Spektrofotometrické stanovení

Měření bylo provedeno v 96-jamkové mělké destičce s plochým dnem. Do destičky jsem nejprve napipetovala standardy (Ascorbic Acid Standard): celkem 6 standardů, které se lišily v koncentraci, a jejich replikáty (viz Tabulka 7)

**Tabulka 7 – Příprava Ascorbic Acid Standard**

	Voda (μl)	Standard (μl)
1.	100	0
2.	98	2
3.	96	4
4.	94	6
5.	92	8
6.	90	10

Poté jsem do destičky napipetovala vzorky a smísila je s obsahy jednotlivých roztoků reagensů dle návodu výrobce. Spektrofotometrické stanovení absorbance jsem provedla na spektrofotometru (SpectraMax 340PC), v programu Soft Max Pro, při vlnové délce 593 nm. Blank byla v tomto případě voda s Master Reaction Mix. Pro výpočet koncentrace kyseliny askorbové byla použita rovnice lineární regresní přímky:  $y = 7,6017x + 0,1837$  v případě stanovení obsahu kyseliny askorbové v proliferaci a 1. týdnu maturace,  $y = 10,014x - 0,1847$  v případě stanovení obsahu ve 3. a 5. týdnu maturace,  $y = \text{koncentrace kyseliny askorbové v nmolech}$ ,  $x = \text{absorbance}$ ). Rovnice byla vypočtena z kalibrační křivky Ascorbic Acid Standard.

### 5.3.7 Stanovení obsahu glutathionu

Stanovení obsahu glutathionu jsem provedla pomocí komerčně dodávaného kitu (Biotech® GSH/GSSG-412™, viz Tabulka 8), kde se kolorimetrickým stanovením určí obsah redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu, a je tedy možné zjistit jejich vzájemný poměr.

**Tabulka 8 – Biotech® GSH/GSSG-412™**

<b>Obsah balení:</b>	
Assay Buffer	Na·PO <sub>4</sub> s EDTA-rozpustit v 650 ml vody.
GSSG Buffer	Na·PO <sub>4</sub> s EDTA
Enzym	Glutathion reduktáza v Na·PO <sub>4</sub> s EDTA
NADPH	β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfát s tris bází a manitolem- rozpustit v 7,5 ml Assay Buffer
Scavenger	1-methyl-2-vinyl pyridium trifluorometan sulfonát (M2VP) v HCl
Chromogen	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová) v Na·PO <sub>4</sub> s EDTA, s etanolem
Standard	GSSG v KPO <sub>4</sub> Buffer s EDTA
5 % kyselina metafosforečná (MPA)	1 g MPA rozpustit v 20 ml vody

#### 5.3.7.1 Odběr materiálu

Vzorky jsem odebrala vždy na konci týdenního subkultivačního intervalu, a to jednou na počátku experimentu (odběr tedy odpovídá stavu kultury, která byla vysazována na maturační médium) a dále pak každý týden maturace (6 týdnů). Nicméně stanovení obsahu glutathionu jsem provedla

pouze v proliferaci, 1., 3. a 5. týdnů maturace. V proliferaci a do konce 4. týdne maturace jsem odebrala ESM jako celek, v 5. a 6. týdnů maturace jsem izolovala jednotlivá embrya. Celkem jsem každý týden pro každou variantu odebrala 8 vzorků o navážce cca 100 mg (4 vzorky pro stanovení obsahu GSH a 4 vzorky pro stanovení obsahu GSSG). Každý vzorek jsem navážila do předem označené mikrozkušavky s propíchnutým víčkem a ihned jsem ji vložila do termonádoby s tekutým dusíkem. Takto odebrané vzorky byly uchovány při -80 °C a připraveny pro další zpracování.

Při přípravě vzorků pro stanovení obsahu glutathionu bylo postupováno dle návodu výrobce kitu.

#### 5.3.7.2 Příprava vzorku pro stanovení obsahu GSSG

Do mikrozkušavky se vzorkem pro stanovení obsahu GSSG jsem přidala 10 µl roztoku Scavenger (M2VP), dále jsem přidala dvě homogenizační kuličky a vzorek jsem zhomogenizovala na kulovém mlýnku (Retsch MM301) po dobu 3 min při frekvenci 15 Hz/s. Ke zhomogenizovanému vzorku jsem přidala 290 µl roztoku MPA, následně jsem vzorek protřepala. Poté jsem vzorky centrifugovala při 13 000x g, 10 min, při 4 °C (Hettich Universal 32R). Ze vzorku jsem odebrala 50 µl supernatantu do nové mikrozkušavky a přidala jsem 700 µl roztoku GSSG Buffer. Takto připravené vzorky jsem až do měření uchovávala na ledu.

#### 5.3.7.3 Příprava blanku na GSSG

Smíchala jsem 50 µl MPA s 700 µl GSSG Buffer. Takto připravený blank jsem až do měření uchovávala na ledu.

#### 5.3.7.4 Příprava vzorku pro stanovení obsahu GSH

Do mikrozkušavky se vzorkem pro stanovení GSH jsem přidala dvě homogenizační kuličky a vzorek jsem zhomogenizovala na kulovém mlýnku po dobu 3 min při frekvenci 15 Hz/s. Ke zhomogenizovanému vzorku jsem přidala 350 µl roztoku MPA, následně jsem vzorek protřepala. Poté jsem vzorky centrifugovala při 13 000x g, 10 min, při 4 °C (Hettich Universal 32R). Ze vzorku jsem odebrala 50 µl supernatantu do nové mikrozkušavky a přidala jsem 3 ml Assay Buffer. Takto připravené vzorky jsem až do měření uchovávala na ledu.

#### 5.3.7.5 Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrické stanovení absorbance jsem prováděla na spektrofotometru (Unicam Helios α) při vlnové délce 412 nm, délku měření jsem nastavila na 3 min. Do jednorázové plastové kyvety jsem napipetovala 200 µl standardu/blanku/vzorku, přidala jsem 200 µl Chromogenu, dále jsem přidala 200 µl z lahvičky označené Enzym. Takto připravený vzorek jsem nechala inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Poté jsem ke vzorku přidala 200 µl z lahvičky označené NADPH a měřila

absorbanci. Nejprve jsem změřila blank, následovaly standardy a poté další vzorky. Pro výpočet koncentrace GSH byla použita rovnice lineární regresní přímky:  $y = 0,1447x + 0,0004$  ( $x$ = absorbance,  $y$ = koncentrace GSH v  $\mu\text{M/g}$ ). Rovnice byla vypočtena z kalibrační křivky standardů pro GSH. Pro výpočet koncentrace GSSG byla použita rovnice lineární regresní přímky:  $y = 0,1475x - 0,0000$  ( $x$ = absorbance,  $y$ = koncentrace GSSG v  $\mu\text{M/g}$ ). Rovnice byla vypočtena z kalibrační křivky standardů pro GSSG.

### **5.3.8 Stanovení obsahu vybraných fytohormonů**

Ve spolupráci s Laboratoří hormonálních regulací u rostlin (ÚEB AV ČR, Dr. Motyka) bylo v mnou dodaném materiálu provedeno stanovení obsahu vybraných fytohormonů v proliferační a prvních fázích maturace. Jednalo se o fytohormony, které mají kyselý nebo neutrální charakter (tzv. frakce A): auxiny, kyselinu abscisovou (ABA), jasmonáty (JA), kyselinu salicylovou (SA) a kyselinu benzoovou (BzA). Stanovení obsahu fytohormonů probíhalo pomocí HPLC: ESI- MS/MS (vysokoúčinný kapalinový chromatograf s Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, United States) spojený s hmotnostním spektrometrem (3200 Q TRAP, Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) (viz např. Vondrakova et al., 2018).

#### **5.3.8.1 Odběr materiálu**

Vzorky jsem odebrala vždy na konci týdenního subkultivačního intervalu, a to jednou na počátku experimentu (odběr tedy odpovídá stavu kultury, která byla vysazována na maturační médium) a dále pak každý týden během časných fází maturace (3 týdny). Celkem jsem každý týden pro každou variantu odebrala 3 vzorky. Každý vzorek jsem navážila do předem označené mikrozkušavky s propíchnutým víčkem a podle instrukcí Laboratoře hormonálních regulací jsem ji ihned vložila do termonádoby s tekutým dusíkem. Takto odebrané vzorky byly uchovány hluboce zmrazené v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posléze vysušeny lyofilizací a předány do ÚEB k další analýze.

### **5.4 Zpracování dat**

Výpočty a grafické zpracování dat probíhalo v programu Microsoft Office Excel. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu NCSS 9 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA). Pro statistické hodnocení dat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA). Při normálním rozdělení dat byl k hodnocení použit Tukey-Kramer test, pokud nebyla data rozdělena normálně, byl k hodnocení použit Kruskal-Wallis Z test. Hladina významnosti byla zvolena u všech testů  $\alpha = 0,05$ .

## **5.5 Přehled jednotlivých experimentů a jejich využití pro jednotlivé typy analýz**

- **Experiment 1**
  - Test metodiky použití vhodných kultivačních metod a podmínek při práci s embryogenní kulturou během proliferace a maturace
  - Počet zralých somatických embryí na konci 5. a 6. týdne maturace
- **Experiment 2**
  - Výtěžnost
  - Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů a škrobu
- **Experiment 3**
  - Anatomická analýza
  - Biochemické stanovení obsahu fenolických látek
- **Experiment 4**
  - Opakování výtěžnosti
  - Opakování stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů a škrobu
  - Opakování biochemického stanovení obsahu fenolických látek
- **Experiment 5**
  - Stanovení obsahu kyseliny askorbové
  - Stanovení obsahu glutathionu
- **Experiment 6**
  - Stanovení obsahu vybraných fytohormonů



## 6 Výsledky

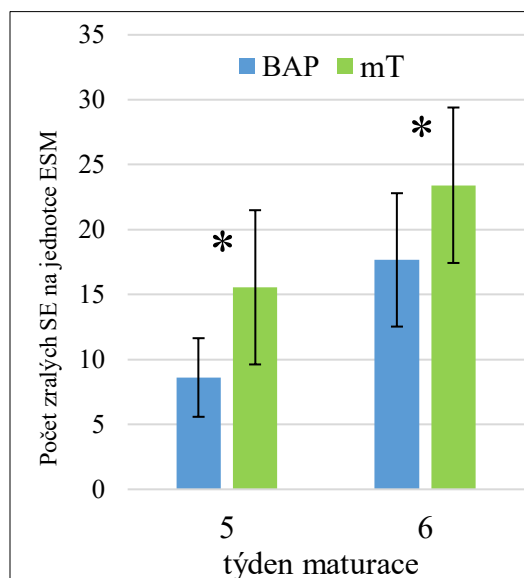
V rámci diplomové práce jsem sledovala vliv záměny typu aplikovaného cytokininu během proliferace na vybrané charakteristiky embryogenní kultury v proliferaci a maturaci, které jsou detailněji popsány v následujících kapitolách. Hodnocení kultury, respektive odběry pro jednotlivé analýzy byly prováděny vždy na konci týdenního subkultivačního intervalu.

Pro větší přehlednost budou v následujícím textu jednotlivé experimentální varianty kultivace embryogenní kultury smrku ztepilého uváděny pod těmito zkratkami:

- **BAP** - varianta používající jako výchozí materiál kulturu dlouhodobě udržovanou (proliferující) na médiu s 6-benzylaminopurinem (BAP)
- **mT** - varianta používající jako výchozí materiál kulturu dlouhodobě udržovanou (proliferující) na médiu s *meta*-topolinem (mT)

### 6.1 Vliv záměny BAP za mT na počet zralých SE

V prvním experimentu jsem počítala zralá SE v kotyledonárním stádiu bez známek abnormalit, vyvinutá na jednotce (kousku) vysazované embryonálně suspenzorové hmoty (ESM; jeden kousek ESM odpovídá cca 0,06-0,08 g) v 5. a 6. týdnu maturace. Protože se jednalo pouze o orientační kvantifikaci, nebyl počet SE vyjádřen na jednotku hmotnosti. Počet zralých SE v 5. a 6. týdnu maturace byl v případě mT signifikantně vyšší než u BAP (Graf 1). Kromě toho se ukázalo, že se v 6. týdnu maturace počet zralých SE v porovnání s 5. týdnem maturace ještě zvýšil. Z tohoto důvodu jsem další experiment prodloužila do 7. týdne maturace. Předpokládala jsem, že se počet SE zvýší i na konci 7. týdne maturace, ale zároveň zatím nedochází ke snížení kvality SE.

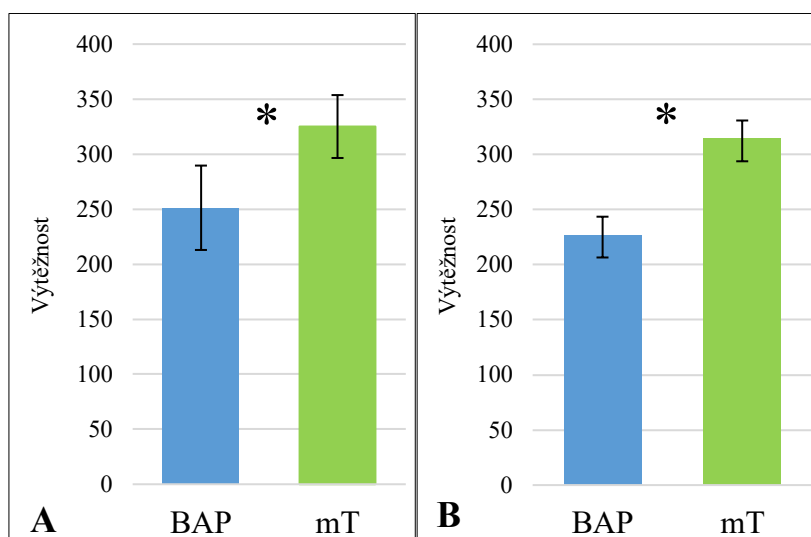


**Graf 1.** Vliv záměny BAP za mT na počet zralých SE v 5. a 6. týdnu maturace vytvořených na jednotce vysazované embryonálně suspenzorové hmoty (ESM). Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ ,  $n=36$ .

## 6.2 Vliv záměny BAP za *mT* na výtěžnost

V tomto experimentu jsem sledovala vliv záměny BAP za *mT* na výtěžnost, tedy na počet zralých normálně se vyvíjejících SE v kotyledonárním stádiu v 7. týdnu maturace vyjádřených na jednotku hmotnosti (v tomto případě na 1 g) vysazované čerstvé ESM na začátku maturace (Graf 2A). K vyjádření na jednotku hmotnosti došlo proto, aby se zpřesnila předchozí orientační kvantifikace. V případě BAP jsem spočítala průměrně 251 SE na 1 g vysazované ESM a v případě *mT* průměrně 325 SE na 1 g vysazované ESM. U tohoto experimentu jsem provedla opakování (Graf 2B), během něhož byl pozorován u obou variant slabý pokles v počtu SE, v případě BAP průměrně 225 SE na 1 g vysazované ESM a v případě *mT* průměrně 312 SE na 1 g vysazované ESM. V obou případech byl počet zralých SE v 7. týdnu maturace signifikantně vyšší ve variantě s *mT* než ve variantě s BAP.

Jelikož byl tento experiment prodloužen do 7. týdne maturace, sledovala jsem i na makroskopické úrovni stav embryogenní kultury a kvalitu SE. Do 6. týdne maturace jsem až na typicky mírné hnědnutí kultury (každý maturační experiment byl doprovázen postupným mírným hnědnutím kultury) nesledovala téměř žádné zhoršení kvality kultury ani SE u žádné varianty. V 7. týdnu maturace u varianty BAP bylo pozorováno občasné „kalusovatění“ (ztráta integrity původně celistvé povrchové struktury- protodermis) či tloustnutí SE. Kromě toho bylo u varianty BAP občas pozorováno výrazně tmavší hnědnutí kultury, s čímž souviselo velmi často následné snížení počtu vytvořených SE a snížení jejich kvality. U varianty *mT* byl v 7. týdnu maturace tento trend s výrazným hnědnutím pozorován méně často.



**Graf 2.** Vliv záměny BAP za *mT* na výtěžnost, tj. počet zralých SE v 7. týdnu maturace vyjádřených na 1 g vysazované ESM (embryonálně suspenzorové hmoty) na začátku maturace. **A.** První provedení experimentu.  $n=72-81$ . **B.** Opakování experimentu.  $n=90$ . Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

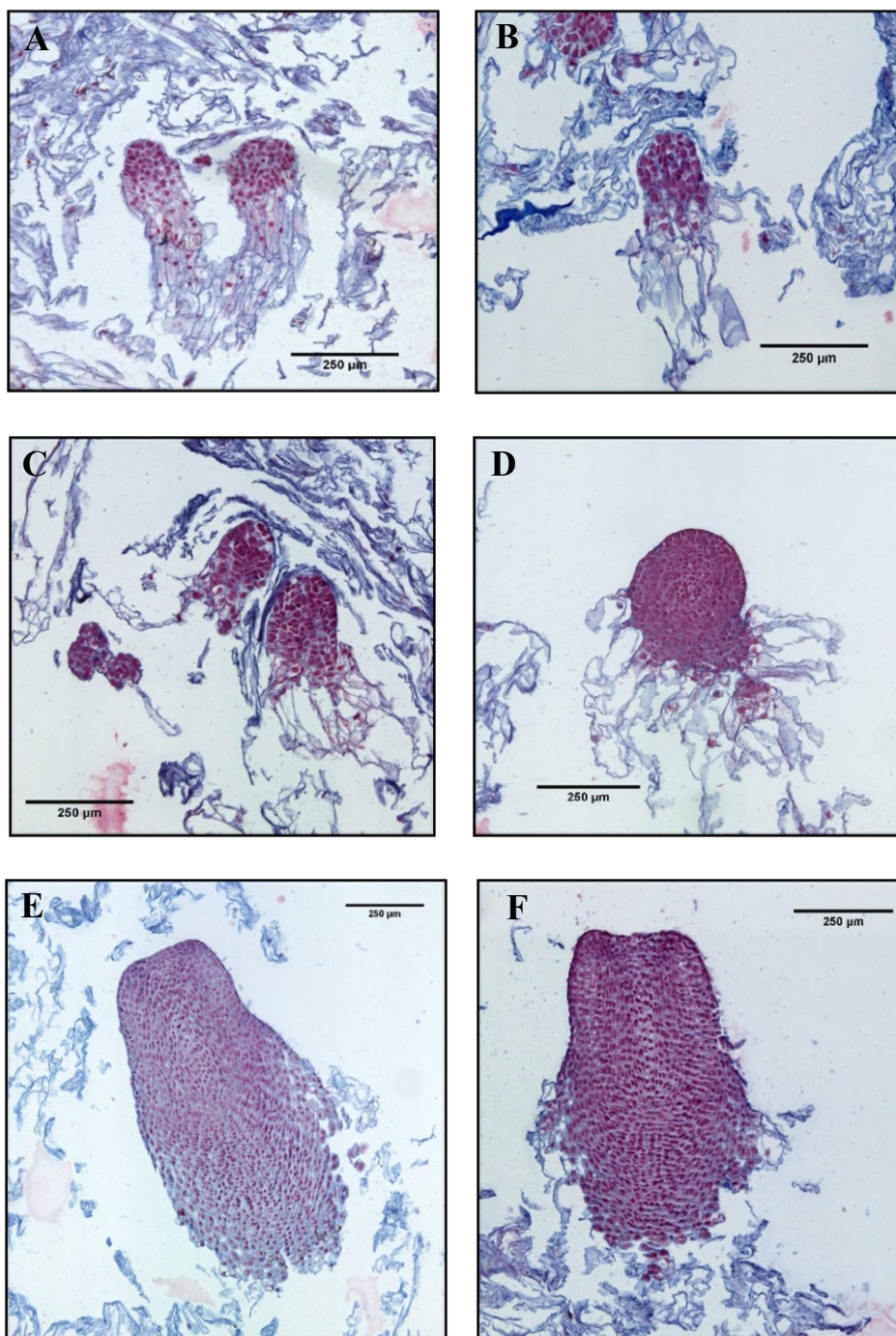
### 6.3 Vliv záměny BAP za *mT* na průběh maturace a na velikost kotyledonárních SE

Z důvodu pozorovaného signifikantně vyššího výtěžku zralých SE v případě *mT* varianty v předchozích experimentech mě zajímalo, zda mezi variantami nejsou rozdíly v rychlosti vývoje SE během maturace. Sledovala jsem tedy vliv záměny BAP za *mT* na nástup a průběh jednotlivých vývojových stádií SE pomocí trvalých anatomických preparátů. Ke kategorizaci vývoje jsem využila publikovanou vývojovou stupnici dle Svobodova et al. (1999). Jedná se o zjednodušenou formu semikvantitativního sledování vývoje (Tabulka 9, viz kapitola 5.3.4.3).

V 1. týdnu maturace u obou variant ještě převažovala typická raná SE (Obrázek 4A, B). Raná SE jsou bipolární struktury, které jsou v apikální části složené z malých meristematických buněk s hustou cytoplazmou, na které navazují dlouhé vakuolizované buňky suspensoru (bazální část raného SE). Kromě raných SE byla u obou variant na konci 1. týdne maturace přítomna také embrya cylindrického tvaru (tzv. cylindrická embrya), která měla často ustanovený protoderm (tvoří základ pokožky). U cylindrického embrya byly stále přítomné živé suspensorové buňky. V 2. týdnu maturace u obou variant již převažovala embrya cylindrická (Obrázek 4D), která měla na bazální straně meristematické oblasti pozorovatelnou kořenovou čepičku. V kultuře byla často pozorovatelná i raná SE (Obrázek 4C). U varianty *mT* se ojediněle objevila prekotyledonární embrya, u kterých byly již pozorovatelné prokambiólní provazce (tvoří základ vodivých pletiv) Ve 3. týdnu maturace se embrya dále zvětšovala, u obou variant převažovala prekotyledonární embrya (Obrázek 4E, F), u varianty BAP byla pozorována častěji embrya cylindrická než u varianty *mT* a u varianty *mT* se ojediněle objevila kotyledonární embrya. U kotyledonárních embryí byly pozorovatelné dělohy a v jejich středu apikální meristém prýtu. Ve 4. týdnu se u obou variant vyskytovala kromě prekotyledonárních embryí i kotyledonární embrya. V 5., 6. a 7. týdnu maturace docházelo k dalšímu prodlužování embryí a dokončení vývoje děloh. Zralá SE měla dobře vyvinuté dělohy, prokambiólní provazce, apikální meristém prýtu a kořene.

**Tabulka 9** - Průběh vývoje SE během maturace. Pro každý týden maturace je uvedeno typické vývojové stádium, v závorce jsou uvedeny stádia, která se objevovala pouze ojediněle. ESE - rané somatické embryo, CY - cylindrické embryo, PRE - prekotyledonární embryo, CO - kotyledonární embryo.

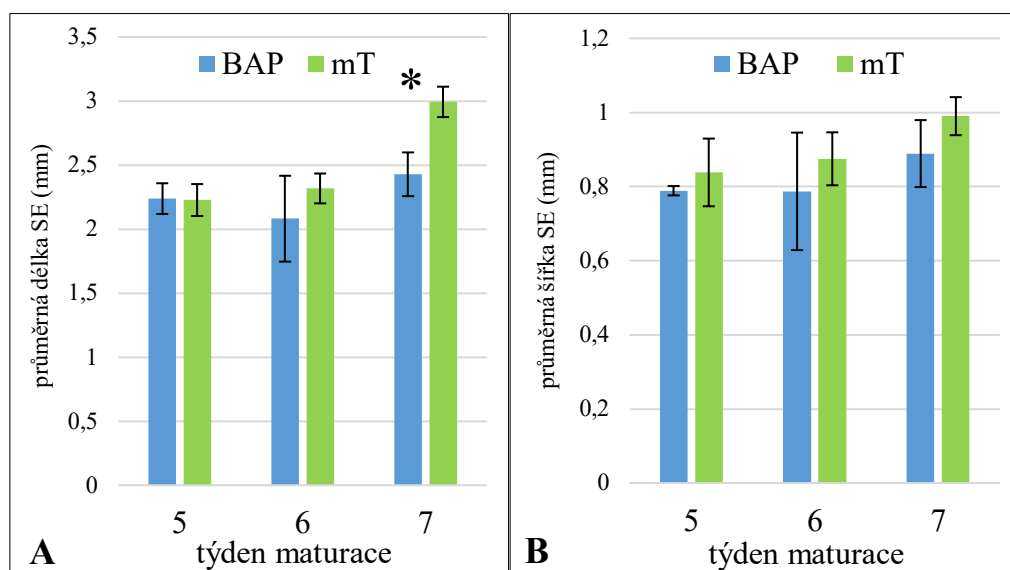
Týden maturace	BAP	<i>mT</i>
1	ESE, (CY)	ESE, CY
2	ESE, CY	ESE, CY, (PRE)
3	CY, PRE, (ESE)	CY, PRE, (CO)
4	PRE, CO	PRE, CO
5	CO	CO
6	CO	CO
7	CO	CO



**Obrázek 4.** Anatomická studie vývojových stádií SE u BAP (A, C, E) a *mT* (B, D, F) v konkrétním týdnu maturace. Rané SE v 1. týdnu maturace u BAP (A) a u *mT* (B). C. Zvětšující se raná SE v 2. týdnu maturace u BAP. D. Cylindrické embryo v 2. týdnu maturace u *mT*. E. Prekotyledonární SE ve 3. týdnu maturace u BAP. F. Přechod mezi prekotyledonárním a kotyledonárním SE ve 3. týdnu maturace u *mT*. Měřítka odpovídá 250 µm. Trvalé preparáty (Histoplast, 12 µm silné), barveno pravou jádrovou červení a alcianovou modří.

U mediálních řezů kotyledonárních SE jsem provedla základní orientační kvantitativní analýzu s cílem zjistit, zda záměna aplikovaného cytokininu měla vliv na velikost SE (délku a šířku meristematických oblastí) v 5., 6. a 7. týdnu maturace. Na trvalých anatomických preparátech jsem měřila délku (Graf 3A) a šířku (Graf 3B) meristematických oblastí kotyledonárních embryí (viz kapitola 5.3.4.3). V 5. a 6. týdnu maturace byla pozorována u obou variant velmi podobná délka

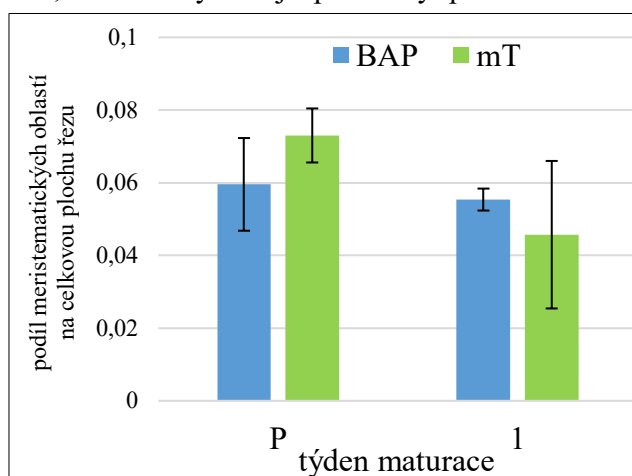
SE. Signifikantně delší SE byla pozorována v 7. týdnu maturace u varianty *mT*. Pokud jde o šířku, tak mezi variantami nebyly žádné statisticky významné rozdíly, je zde pozorovatelný mírný trend ve větší průměrné šířce SE v případě *mT*.



**Graf 3.** Vliv záměny BAP za *mT* na průměrnou délku (A) a šířku (B) SE embryí v 5., 6. a 7. týdnu maturace.  $n=3-7$ . Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

#### 6.4 Vliv záměny BAP za *mT* na poměrné zastoupení plochy meristematických oblastí

Z výsledků prvotních experimentů je zřejmé, že výtěžek zralých SE je v případě *mT* signifikantně vyšší. Z tohoto důvodu jsem v dalším experimentu sledovala, zda se varianty nelišily v podílu plochy meristematických oblastí na celkovou plochu řezu na trvalých anatomických preparátech v proliferaci a 1. týdnu maturace. Plochy řezů byly hodnoceny bodovou metodou ze sériových řezů (viz kapitola 5.3.4.4). Mezi variantami nebyly žádné statisticky významné rozdíly (Graf 4). Z grafu je patrný mírný trend snížení podílu meristematických oblastí v 1. týdnu maturace v porovnání s proliferací u obou variant, nicméně výraznější pokles byl pozorován u *mT* varianty.

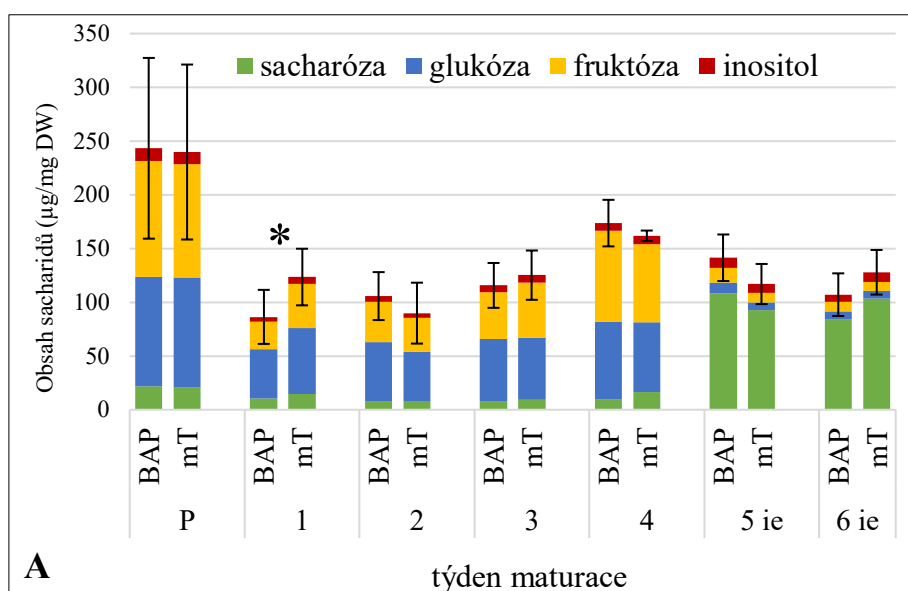


**Graf 4.** Vliv záměny BAP za *mT* na podíl meristematických oblastí na celkovou plochu řezu v proliferaci a 1. týdnu maturace.  $n=3$ , každý jedinec ( $n$ ) složen z 5 řezů. P-proliferace. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA.

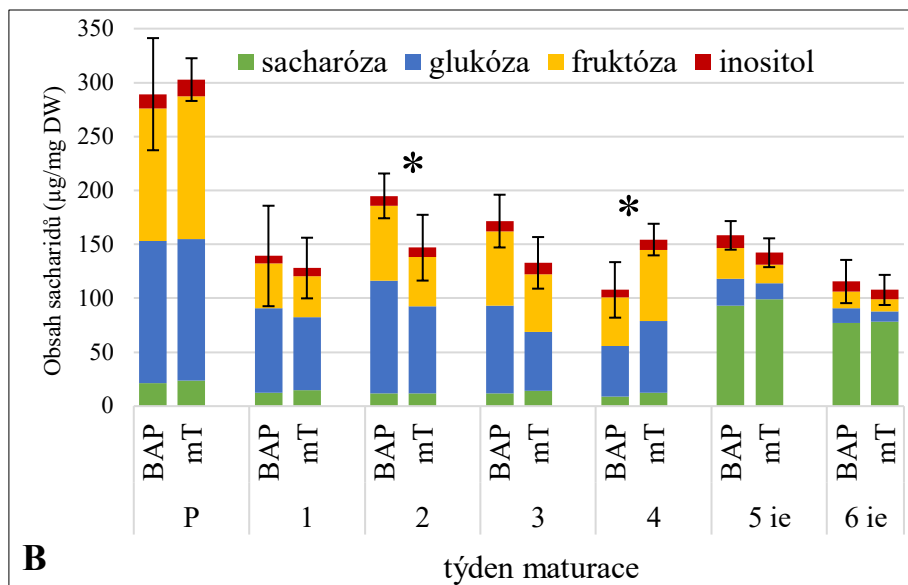
## 6.5 Vliv záměny BAP za *mT* na obsah a spektrum endogenních nestrukturních sacharidů

Na základě předchozích experimentů jsem pozorovala již několik rozdílů mezi variantami BAP a *mT*, které byly ovšem pravděpodobně způsobeny časovým posunem vývoje. Proto mě dále zajímalo, zda se embrya u obou variant vyvíjela dle pravidelného plánu nebo mezi nimi byly pozorovatelné nějaké odchylky. Jako biochemický marker pravidelného vývoje jsem vybrala experiment, který sledoval obsah a spektrum endogenních nestrukturních sacharidů v proliferační a maturaci. Vývoj kvalitních SE je charakterizován poklesem v obsahu celkových sacharidů a zvyšujícím se poměrem sacharózy/hexózy (SUC/HEX) (Lipavská and Konradová, 2004).

V prvním provedení experimentu (Graf 5A) lze pozorovat podobný trend v obsahu, dynamice a spektru sacharidů u obou variant. Obsah celkových sacharidů byl nejvyšší v proliferační, na počátku maturace došlo k poklesu a poté docházelo k mírnému kolísání až do 6. týdne maturace. V proliferační a v prvních fázích maturace v rámci ESM převažovaly hexózy (podobné množství fruktózy a glukózy), nevyskytovala se téměř žádná sacharóza. Během vývoje SE došlo k poklesu obsahu hexóz a naopak se zvýšil obsah sacharózy. Jelikož v 5. a 6. týdnu maturace bylo možné izolovat jednotlivá SE od zbytkové ESM, je zřetelně vidět, že sacharóza byla hlavním sacharidem v SE a nikoliv v okolní ESM. Statisticky významně vyšší obsah celkových sacharidů byl pozorován v 1. týdnu maturace u *mT* varianty. U tohoto experimentu bylo provedeno opakování (Graf 5B). Během opakování byl zde podobný trend v obsahu a spektru sacharidů jako při prvním provedení. Statisticky významně vyšší obsah celkových sacharidů byl pozorovatelný v 2. týdnu maturace ve prospěch BAP a ve 4. týdnu maturace ve prospěch *mT*, pozorované změny tedy nebyly mezi oběma opakováními konzistentní.

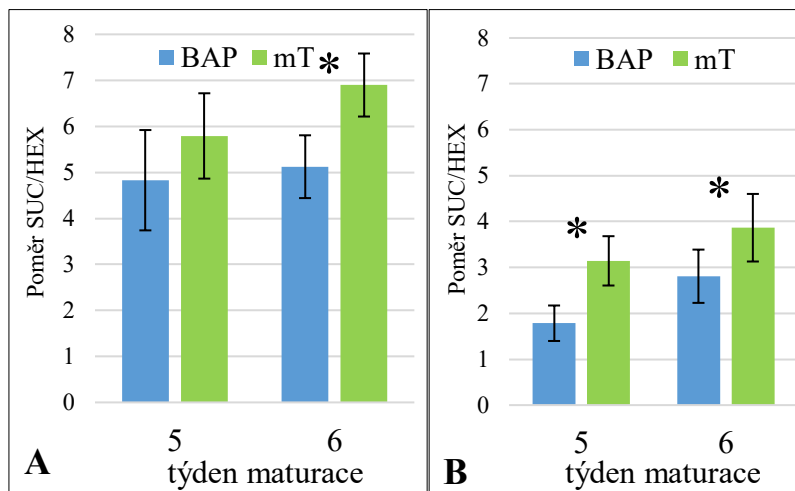






**Graf 5.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah a spektrum endogenních nestrukturních sacharidů v proliferaci a maturaci. **A.** První provedení experimentu.  $n=5-6$ . **B.** Opakování experimentu.  $n=6$ . P-proliferace. ie- izolovaná embrya. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky obsahu celkových sacharidů, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině  $\alpha=0,05$ .

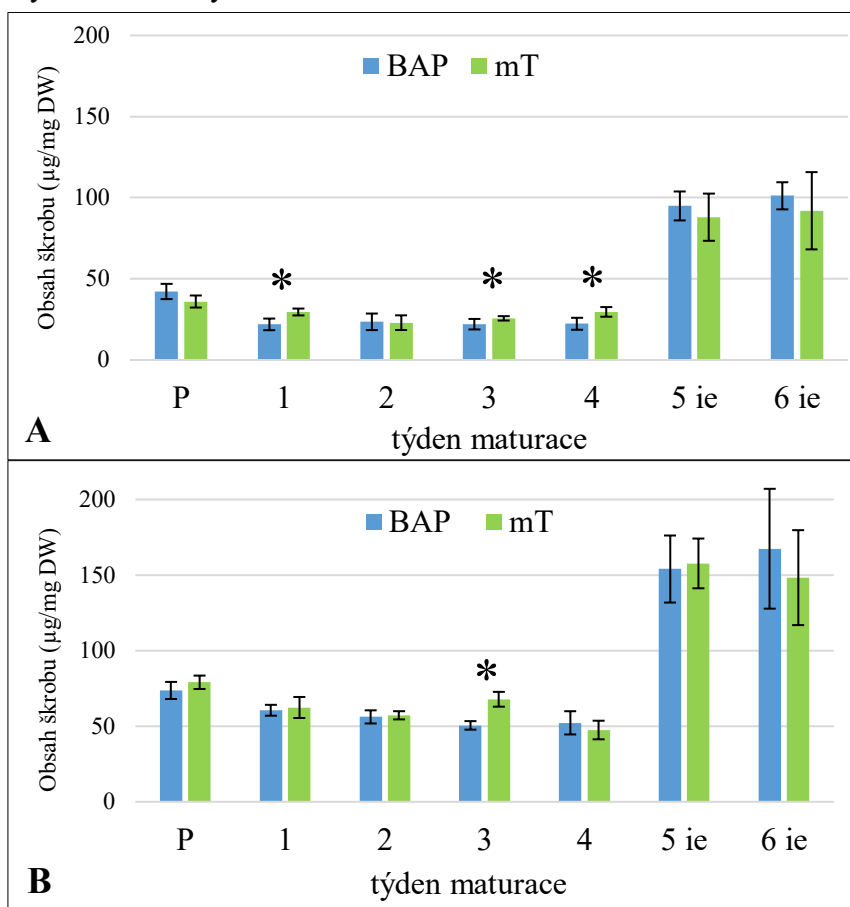
Během analýzy sacharidů jsem podrobněji sledovala poměr sacharózy ku hexózám (glukóza + fruktóza) (SUC/HEX) v izolovaných SE v 5. a 6. týdnu maturace. Vyšší poměr SUC/HEX ve prospěch sacharózy je jeden z dalších přijímaných markerů kvalitních zralých SE. V prvním provedení experimentu (Graf 6A) byl pozorován signifikantně vyšší poměr SUC/HEX ve prospěch sacharózy u varianty *mT* v 6. týdnu maturace a během opakování experimentu (Graf 6B) v 5. a 6. týdnu maturace taktéž u varianty *mT*.



**Graf 6.** Vliv záměny BAP za *mT* na poměr SUC/HEX (poměr sacharózy ku hexózám) v 5. a 6. týdnu maturace. **A.** První provedení experimentu.  $n=5-6$ . **B.** Opakování experimentu.  $n=6$ . Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

## 6.6 Vliv záměny BAP za *mT* na obsah škrobu

Kromě poklesu v obsahu celkových sacharidů a vyššího SUC/HEX poměru slouží jako marker pravidelného vývoje nízký obsah škrobu v rámci ESM a vysoký obsah škrobu v izolovaných SE (Lipavska et al., 2000). V proliferaci a maturaci jsem stanovila obsah škrobu jako obsah glukózy po enzymatickém štěpení. Experiment jsem provedla dvakrát, v prvním provedení experimentu byly hladiny škrobu nižší (Graf 7A) než během opakování experimentu (Graf 7B). U obou provedení byl patrný trend vyššího obsahu škrobu v proliferaci, poté došlo k mírnému poklesu. Vysoký obsah škrobu byl pak detekován v izolovaných embryích v 5. a 6. týdnu maturace. V prvním provedení bylo statisticky významné zvýšení obsahu škrobu pozorováno v 1., 3. a 4. týdnu maturace u varianty *mT*. Během opakování experimentu došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu škrobu ve 3. týdnu maturace u varianty *mT*. Vždy tedy došlo ke statisticky významnému zvýšení u varianty *mT*.



**Graf 7.** Vliv záměny BAP za *mT* na celkový obsah škrobu v proliferaci a maturaci. Obsah škrobu jsem stanovila jako obsah glukózy po enzymatickém štěpení. **A.** První provedení experimentu.  $n=6$ . **B.** Opakování experimentu.  $n=6$ . P-proliferace. ie- izolovaná embrya. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

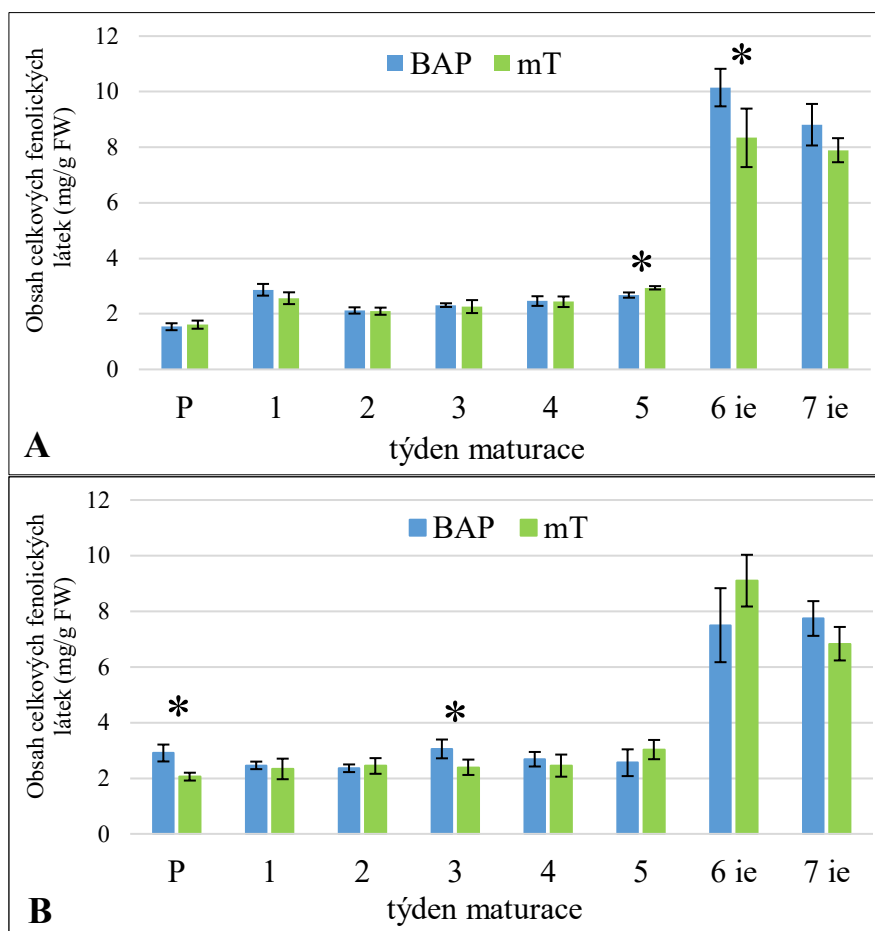
## 6.7 Vliv záměny BAP za *mT* na obsah celkových fenolických látek

Během dlouhodobého pozorování embryogenní kultury jsem si všimla, že varianta BAP v pozdějších fázích maturace a také při prodlouženém subkultivačním intervalu během proliferace (embryogenní kultury byly z bezpečnostních důvodů uchovávány vždy déle než jeden týden, dokud



nebylo zřejmé, že nově pasážované kultury byly přesazeny správně a docházelo k dalšímu množení SE) vykazovala dříve známky typické pro stárnoucí kultury - hnědnutí embryogenní kultury. Hnědnutí kultury je typicky výsledkem oxidace nahromaděných fenolických látek a jedná se údajně o následek oxidativního stresu (Laukannen et al., 2000; Baskaran et al., 2015; Sahebi et al., 2016).

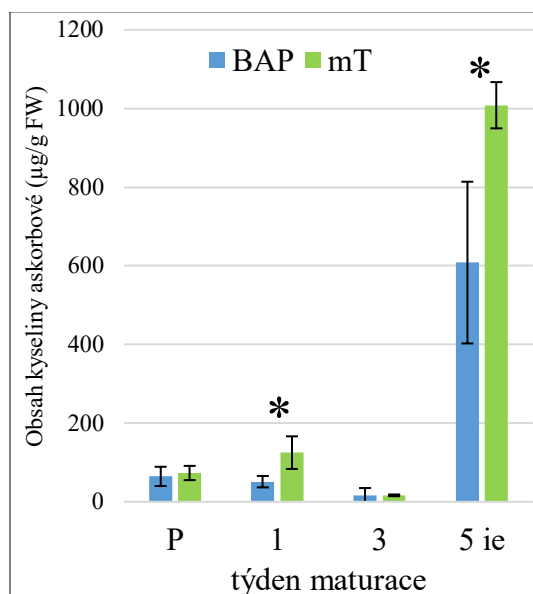
Z tohoto důvodu mě v dalším experimentu zajímal vliv záměny BAP za *mT* na obsah celkových fenolických látek v proliferaci a maturaci (za standardních subkultivačních intervalů), který byl stanoven spektrofotometricky. Experiment jsem provedla dvakrát. U obou provedení pozorujeme velmi podobný trend v obsahu celkových fenolických látek v obou variantách. V proliferaci a až do 5. týdne maturace, kdy jsem odebírala ESM, byla hladina celkových fenolických látek nízká. Vysoký obsah fenolických látek byl detekován v izolovaných SE v 6. a 7. týdnu maturace, jedná se o skutečnost, že se fenolické látky hromadily především ve vyvíjejících se SE. U prvního provedení jsem pozorovala statisticky významné zvýšení obsahu fenolických látek u varianty *mT* v 5. týdnu maturace a u varianty BAP v 6. týdnu maturace (Graf 8A). Opakování experimentu ukázalo statisticky významné zvýšení obsahu fenolických látek u varianty BAP v proliferaci a v 3. týdnu maturace (Graf 8B). Pozorované změny tedy nebyly mezi oběma opakováními konzistentní.



**Graf 8.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah celkových fenolických látek v proliferaci a maturaci. **A.** První provedení experimentu. *n*=5. **B.** Opakování experimentu. *n*=5. P-proliferace. ie- izolovaná embrya. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

## 6.8 Vliv záměny BAP za *mT* na obsah kyseliny askorbové

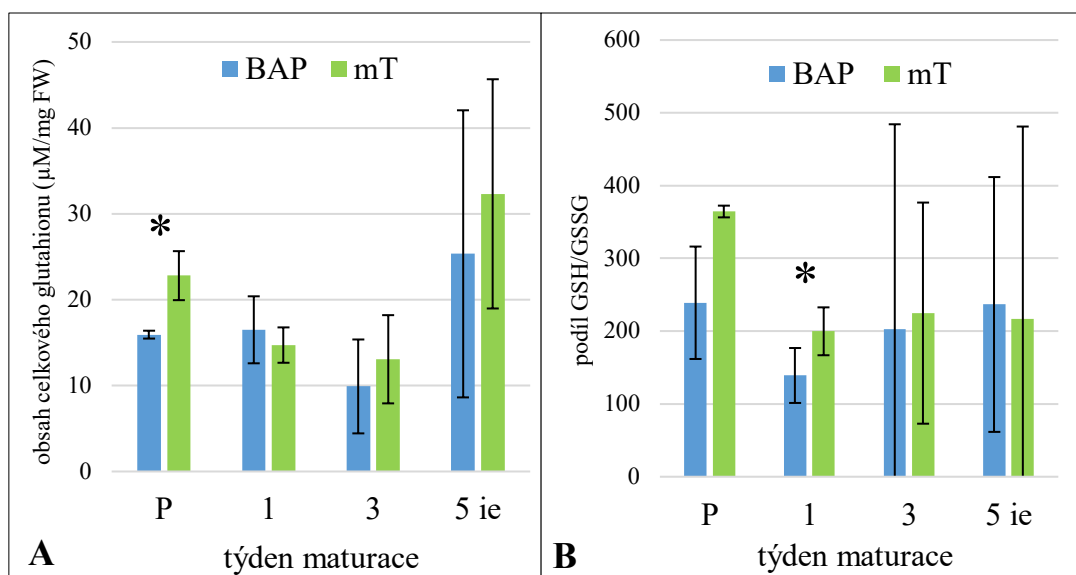
V předchozím experimentu byly rozdíly v obsahu celkových fenolických látek mezi variantami poměrně malé. Rozdílné hnědnutí mohlo být způsobeno rozdílnou mírou oxidace fenolických látek. Další typy experimentů byly proto zaměřeny na stav vybraných nízkomolekulárních antioxidačních systémů. První z nich sledoval vliv záměny BAP za *mT* na obsah kyseliny askorbové, konkrétně jeho redukované formy (ASC) v proliferaci, 1., 3. a 5. týdnu maturace. Vysoký obsah kyseliny askorbové byl v obou variantách detekován v izolovaných embryích v 5. týdnu maturace (Graf 9). V ostatních fázích maturace a v proliferaci byl obsah kyseliny askorbové nízký. Statisticky významně vyšší obsah kyseliny askorbové byl u varianty *mT* pozorován v 1. týdnu maturace a zejména pak v 5. týdnu maturace.



**Graf 9.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah kyseliny askorbové v proliferaci, 1., 3. a 5. týdnu maturace.  $n=4$ . P- proliferace. ie- izolovaná embrya. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

## 6.9 Vliv záměny BAP za *mT* na obsah a podíl forem glutathionu

Další experiment, který byl zaměřen na stav vybraných antioxidačních systémů, sledoval vliv záměny BAP za *mT* na obsah celkového glutathionu (Graf 10A) a podíl redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu (Graf 10B) v proliferaci, 1., 3. a 5. týdnu maturace. V případě *mT* byl pozorován signifikantně vyšší obsah celkového glutathionu v proliferaci a signifikantně vyšší poměr GSH/GSSG v 1. týdnu maturace. Mimoto jsem nepozorovala žádné významné trendy či rozdíly mezi variantami.

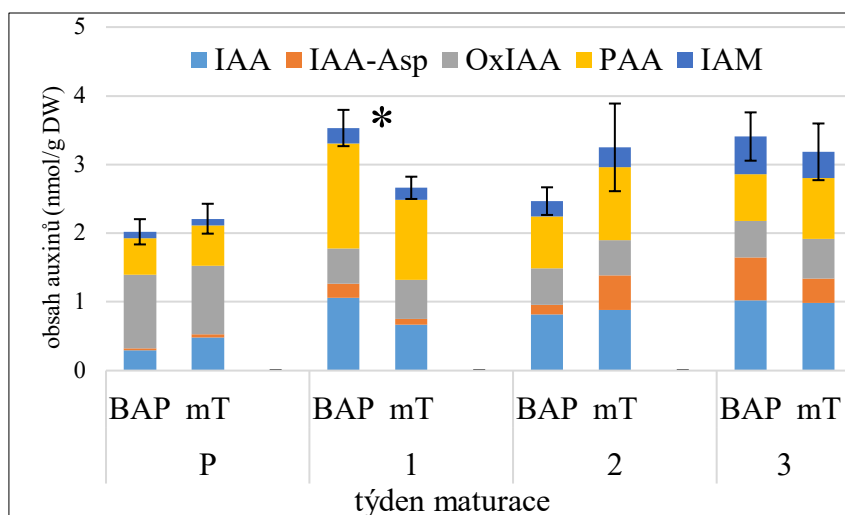


**Graf 10. A.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah celkového glutathionu v proliferaci, 1., 3. a 5. týdnu maturace. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky obsahu celkového glutathionu. **B.** Vliv záměny BAP za *mT* na poměr GSH/GSSG v proliferaci, 1., 3. a 5. týdnu maturace. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.  $n=3-4$ . P-proliferace. ie-izolovaná embrya. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

## 6.10 Vliv záměny BAP za *mT* na obsah vybraných fytohormonů

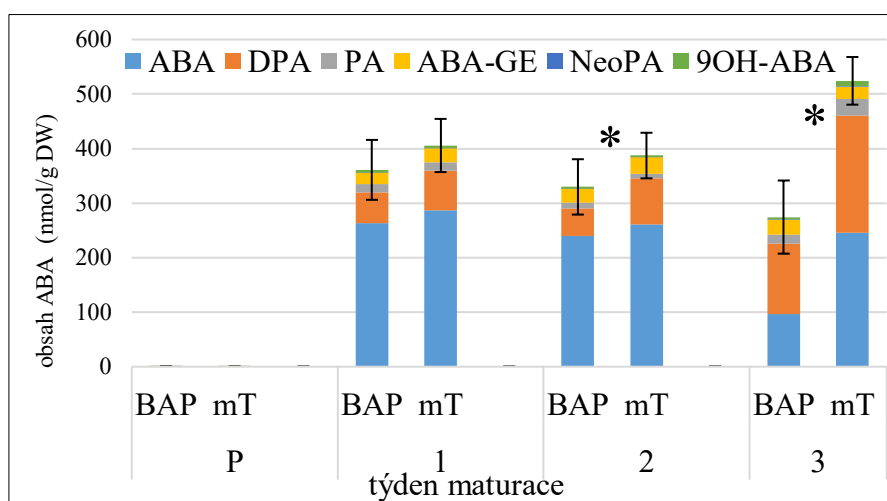
Ve spolupráci s Laboratoří hormonálních regulací u rostlin (ÚEB AV ČR, Dr. Motyka) bylo provedeno stanovení obsahu vybraných fytohormonů v proliferaci a v prvních 3 týdnech maturace. Zajímalo mě, zda záměna BAP za *mT* ovlivnila obsah auxinů a dalších fytohormonů, někdy označovaných jako „stresových“ - kyseliny abscisové (ABA), jasmonátů (JA), kyseliny salicylové (SA) a kyseliny benzoové (BzA).

U linie C bylo detekováno široké spektrum endogenních auxinů zahrnující indolové i neindolové formy. Stranou jsem ponechala vysoké hladiny kyseliny 2, 4- dichlorfenoxycetové (2,4-D), což je syntetický regulátor s auxinovou aktivitou přidávající se do média v proliferaci pro optimální množení a jehož hladiny výrazně převyšovaly hladiny endogenních auxinů. V proliferaci byl pozorován nejnižší obsah celkových auxinů (Graf 11) s převažující složkou oxo-indol-3-octové kyseliny (OxIAA), což je oxidační produkt kyseliny indol-3-octové (IAA). Následoval také poměrně vysoký obsah kyseliny fenyloctové (PAA), což je přirozený slabě aktivní neindolový auxin. V prvních třech týdnech maturace došlo u linie C ke zvýšení obsahu celkových auxinů díky nárůstu množství IAA a PAA, což byly převažující složky spektra auxinů v maturaci. V případě BAP byl v 1. týdnu maturace pozorován signifikantně vyšší obsah celkových auxinů.



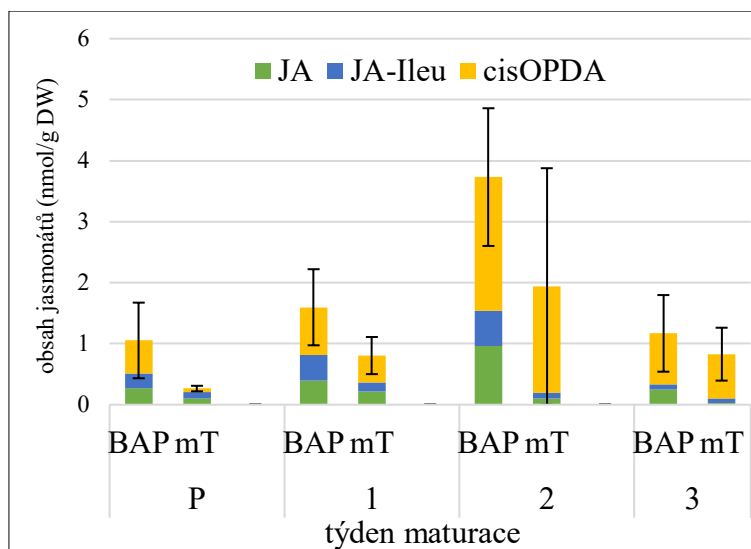
**Graf 11.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah celkových auxinů (vyjma 2,4-D) v proliferaci, 1., 2. a 3. týdnu maturace.  $n=3$ . P-proliferace. IAA- kyselina indol-3-octová, IAA-Asp- kyselina indol-3-octová- aspartát, OxIAA- oxo-indol-3-octová kyselina, PAA- kyselina fenylactová, IAM- indol-3-acetamid. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky obsahu celkových auxinů, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl obsahu celkových auxinů na hladině  $\alpha=0,05$ .

Kromě auxinů byl stanoven i obsah ABA a jejích metabolických forem (Graf 12). U embryogenních kultur smrku je exogenní dodání ABA podmínkou pro zahájení maturace raných SE. U linie C se v proliferaci nevyskytuje téměř žádná ABA ani její metabolické produkty, protože není součástí média a kultura ji sama nesyntetizuje. V maturaci dochází k prudkému nárůstu obsahu ABA a jejích metabolitů. Výrazně převažující složkou spektra je volná kyselina abscisová, následována kyselinou dihydrofazeovou (deaktivní produkt), poté následovalo menší množství kyseliny fazeové (deaktivní produkt) a glukosylesteru kyseliny abscisové (zásobní forma). Ve 2. a 3. týdnu maturace bylo pozorováno signifikantně vyšší množství celkové ABA v případě *mT* varianty. Ve 3. týdnu maturace byl signifikantní nárůst v případě *mT* způsoben výrazným nárůstem volné ABA a kyseliny dihydrofazeové.



**Graf 12.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah ABA v proliferaci, 1., 2. a 3. týdnu maturace.  $n=3$ . P-proliferace. ABA-kyselina abscisová, DPA- kyselina dihydrofazeová, PA- kyselina fazeová, ABA-GE- kyselina abscisová glukosylester, NeoPA- kyselina neofazeová, 9OH-ABA- 9-hydroxy-abscisová kyselina. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky obsahu celkové ABA, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl obsahu celkové ABA na hladině  $\alpha=0,05$ .

Kromě auxinů a ABA byl dále stanoven obsah jasmonátů (Graf 13). U linie C byl detekován relativně nízký obsah jasmonátů v proliferační, 1. a 3. týdnu maturace, k nárůstu celkového obsahu jasmonátů došlo ve 2. týdnu maturace, nicméně mezi 3 opakováními byly pozorované velmi výrazné směrodatné odchylky. Mezi variantami nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.

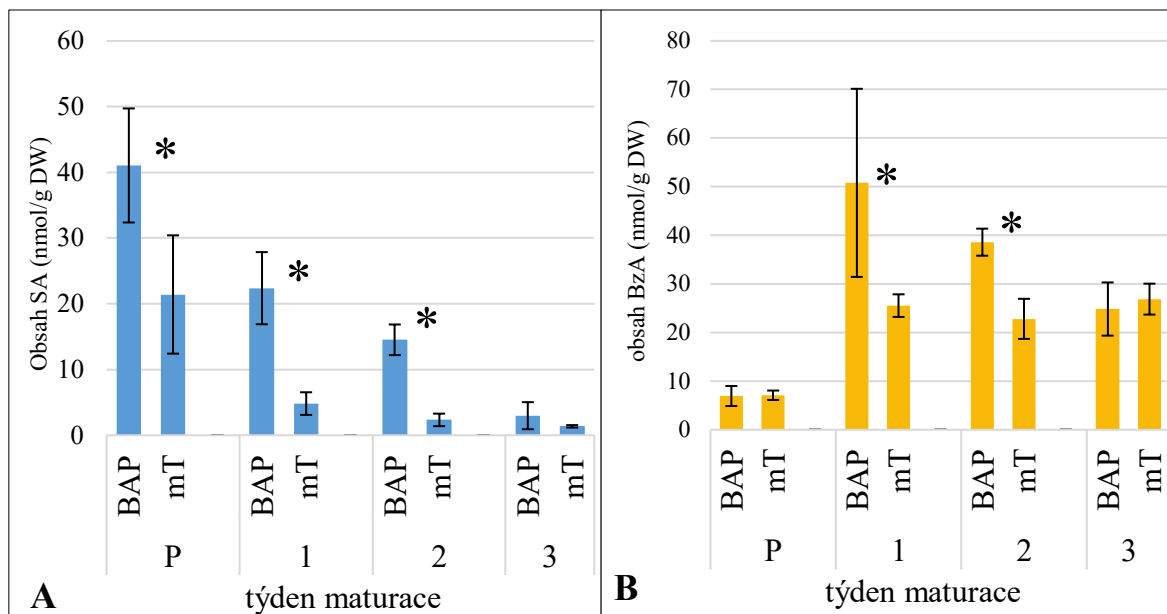


**Graf 13.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah jasmonátů v proliferační, 1., 2. a 3. týdnu maturace.  $n=3$ . P-proliferační. JA- kyselina jasmonová, JA-Ileu- kyselina jasmonová-isoleucin, cisOPDA- cis-12-oxo-fytodienová kyselina. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky obsahu celkových jasmonátů, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl obsahu celkových jasmonátů na hladině  $\alpha=0,05$ .

Poslední fytohormony, jejichž obsah byl stanoven, jsou fenolické sloučeniny - kyselina salicylová (Graf 14A) a kyselina benzoová (Graf 14B).

Co se týče kyseliny salicylové byl zde pozorovatelný trend ve snižování obsahu jejího množství během vývoje SE. Signifikantně vyšší obsah kyseliny salicylové byl pozorovatelný v proliferační, 1. a 2. týdnu maturace u varianty BAP.

Obsah kyseliny benzoové u linie C byl nízký v proliferační a v 1. týdnu maturace došlo k výraznému nárůstu a poté hladiny mírně kolísaly. Signifikantně vyšší obsah kyseliny benzoové byl patrný v 1. a 2. týdnu maturace u varianty BAP.



**Graf 14.** Vliv záměny BAP za *mT* na obsah salicylové kyseliny (**A**) a benzoové kyseliny (**B**) v proliferaci, 1., 2. a 3. týdnu maturace.  $n=3$ . P-proliferace. SA- kyselina salicylová, BzA- kyselina benzoová. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ .

## 7 Diskuze

Proces somatické embryogeneze je ovlivněn mnoha různorodými faktory (viz kapitola 4.1), nicméně klíčovým faktorem je působení fytohormonů. U většiny jehličnanů je během indukce a proliferace kromě auxinů důležitá i role cytokininů (Elhiti and Stasolla, 2012). Morfologické děje, které jsou ovlivněny aplikací auxinu/cytokininu, často reagují odlišně na konkrétní typy auxinu či cytokininu. Někdy, jako např. v somatické embryogenezi jehličnanů se dokonce osvědčilo k vyladění účinku i kombinace dvou typů cytokininů (např. kinetin + BAP). Na základě prostudovaných literárních dat (viz kapitola 4.6.1.1 – 4.6.1.3) a konzultace s Dr. Doležalem (Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a UP) jsme předpokládali, že záměna v aplikaci aromatických cytokininů vyvolá změny, které by mohly pozitivním způsobem ovlivnit proces somatické embryogeneze. Konkrétně jsem zaměnila běžně používaný 6- benzylaminopurin (BAP) za hydroxylovaný derivát BAP - *meta*-topolin (*mT*). BAP je díky své finanční dostupnosti a obecně dobré efektivitě nejčastěji používaný aromatický cytokinin během mikropropagace (Aremu et al., 2012a), tedy i během somatické embryogeneze (Gautier et al., 2018). Jak jsem již uvedla v literárním přehledu (viz kapitola 4.6.1) existuje mnoho případů, kdy je použití BAP během mikropropagace (např. při organogenezi, regeneraci *in vitro*) spojeno s výskytem určitých abnormalit. Právě kvůli těmto problémům se hledají možné alternativy k BAP. Již dříve byl pozorován pozitivní efekt použití *mT* během somatické embryogeneze u *Carica papaya*, kdy vyklíčilo více somatických embryí v případě *mT* (44 % SE) než v případě BAP (40 % SE) (Solorzano-Cascante et al., 2018). Nahrazení BAP za *mT* během somatické embryogeneze by tedy mohlo představovat změnu, která by přispěla k řešení některých slabin spojených s tímto procesem. Nicméně v literatuře chybí studie sledující vliv této záměny u jehličnanů - není zdaleka jisté, že co se v řadě prací osvědčilo, se osvědčí i v procesu somatické embryogeneze jehličnanů, ovšem rozhodně má smysl si takovou otázku položit (Aremu et al., 2012a).

Kromě klíčových fytohormonů se můžeme zamyslet i nad vhodností embryogenní linie, kterou máme pro další výzkum k dispozici. Veškeré experimenty mé práce byly prováděny se stabilní, dobře rostoucí embryogenní linií C, která byla odvozena v našem týmu a dle předběžných výsledků byla vhodná k dalšímu studiu procesu somatické embryogeneze. Linie C vykazovala dobrou rezpozivitu k působení ABA a dobrou a stabilní embryogenní kapacitu, srovnatelnou s liniemi, které byly dlouhodobě týmem používány a jsou považované za modelové (AFO541, C110). Jelikož jsem v rámci diplomové práce sledovala vliv záměny BAP za *mT*, byla linie C dlouhodobě vedena v proliferační (udržovací) fázi ve dvou sub-liniích, ve variantě s BAP a ve variantě s *mT*. A právě proto, že se linie C chová velmi podobně jako „modelové“ linie, je velice pravděpodobné, že reakce této linie na změnu aplikovaného cytokininu bude mít širší platnost a že závěry učiněné s touto linií budou mít obecnější význam.

### 7.1 Výtěžnost zralých SE

Předběžné výsledky mé předchůdkyně Mgr. Hruškové ukázaly, že linie C disponovala dobrým embryogenním potenciálem, a naznačily, že se ve variantě *mT* na konci maturace vytvořilo více

kotyledonárních SE. Sub-linie s *mT* ale v té době ještě nebyla dostatečně dlouho pěstována na udržovacím médiu a experimenty nebyly dostatečně kvantifikovány. Mé experimenty týkající se zvýšeného počtu zralých SE u varianty *mT* tyto předběžné výsledky potvrdily. Linie C se řadí mezi středně embryogenní linie, které jsou charakterizovány od cca 100 SE do cca 1000 SE na 1 g vysazované ESM. Vysoce embryogenní potenciál pak mají linie, které tvoří více než 1000 SE na 1 g vysazované ESM a naopak velmi špatný embryogenní potenciál mají linie, které tvoří pouze pár desítek či méně SE (Gautier et al., 2018). V porovnání s modelovými liniemi AFO541 (výtěžnost 116 SE na 1 g) a C110 (výtěžnost 75 SE na 1 g) (Hudec et al., 2016), linie C vykazovala lepší embryogenní potenciál. Počet SE byl v případě *mT* dokonce signifikantně vyšší než u BAP. U linie C jsem pozorovala rozdíl ve zvýšení počtu SE mezi 5. a 6. a také mezi 6. a 7. týdnem maturace. Předpokládám, že během 6., respektive 7. týdne maturace dospěla další SE do stádia kotyledonárního. Ovšem v případě signifikantně vyššího počtu SE u *mT* by tento trend mohl naznačovat, že vývoj je v případě *mT* rychlejší, nebo, že počet vývojeschopných SE byl po proliferaci vyšší v případě *mT* varianty. Tato otázka bude diskutována níže. Na základě trendu ve zvyšování počtu SE mezi jednotlivými týdny u obou variant, lze také předpokládat, že vývoj SE nebyl zcela synchronní. Pokud by došlo k synchronizaci časného vývoje, pravděpodobně by se zvýšila výtěžnost. Např. autoři v práci Mamun et al. (2018) u *Picea abies* synchronizovali vývoj SE rozptýlením kousků ESM (mechanickým rozprostřením původně kupkovité ESM) a tím 3-4 násobně zvýšili výtěžnost. Nicméně otázkou zůstává, zda tento pozitivní efekt na výtěžnost nelze kromě rozptýlu a následné synchronizaci přičíst také lepší dostupnosti živin v médiu. Kromě toho bylo pozorováno, že při aplikaci velmi nízkých koncentrací latrunkulinu B (aktinová droga, brání polymeraci vláken aktinu) u *Picea abies* došlo k určité synchronizaci vývoje SE, tím že byly zničeny suspensory nedostatečně vyvinutých SE a tudíž byla eliminována na nich závislá SE. Nicméně v tomto případě nedošlo ke zvýšení výtěžku, ale vzniklá SE byla kvalitnější (Vondrakova et al., 2014). Na základě signifikantně vyššího počtu SE v případě *mT* bychom mohli usoudit, že při použití *mT* by mohlo docházet také k určité synchronizaci vývoje. Nicméně tuto myšlenku by bylo nutné podpořit detailnějším studiem vývojových stádií v časných fázích vývoje. Je tedy možné shrnout, že záměna BAP za *mT* měla za následek signifikantní zvýšení počtu zralých SE.

## 7.2 Strukturní vývoj SE

Nyní se vrátím zpět k výše zmíněné otázce, zda aplikace *mT* urychlí vývoj SE. Tento trend byl v případě *mT* potvrzen, konkrétně došlo k urychlení nástupu prekotyledonárního a kotyledonárního stádia o 1 týden. Vývoj linie C byl tedy ve variantě *mT* stejně rychlý jako vývoj linie AFO541 a C110 (Hudec et al., 2016; Svobodova et al., 1999). Pokud bychom se podívali na linii C ve variantě s BAP, tak u ní došlo k pomalejšímu přechodu do stádia prekotyledonárního a kotyledonárního. Urychlení vývoje SE o cca 1-2 týdny bylo pozorováno u linií C110 a AFO541 při použití vyšší koncentrace PEG (5 % a 7,5 %) (Hudec et al., 2016). Kromě toho bylo také pozorováno urychlení vývoje u linie AFO541 při použití latrunkulinu B (Schwarzerova et al., 2010). Je tedy možné shrnout, že nahrazení BAP za *mT* u linie C mírně urychlilo vývoj SE. Kromě toho linie C



nevykazovala žádné odchylky od standardního vývoje (např. vynechané či poškozené stádium SE), což vyplývá z porovnání s dosud publikovanými daty vývoje modelových linií.

Kromě rozdílu v rychlosti vývoje SE, jsem si položila otázku, zda by nebylo možné signifikantně vyšší počet zralých SE v případě *mT* přičíst změnám v podílu meristematických oblastí (tedy časných SE) připravených už na počátku celého procesu vývoje (tedy v období přenosu kultury z proliferačního na maturační médium). V 1. týdnu maturace byl patrný mírný trend snížení podílu meristematických oblastí v porovnání s proliferací, výraznější pokles byl pozorován u *mT* varianty. Pokud by u *mT* převažoval trend ve snižování plochy meristematických oblastí i ve 2. týdnu maturace, mohlo by se jednat o náznak efektivnějšího odstranění nebo zastavení vývoje nevhodných SE. Z tohoto důvodu by bylo vhodné provést tuto analýzu i ve 2. týdnu maturace, zde by již ale vypovídací hodnotu výsledků nejspíš ovlivňoval pozorovaný trend v urychlení vývoje. Hodnotila jsem 3 náhodně vybrané kousky (kupky) ESM, ze kterých jsem sledovala 5 náhodně vybraných dostatečně od sebe vzdálených řezů. Nicméně i přesto, že je embryogenní kultura velmi heterogenní materiál, tak v rámci vybraného kousku ESM byl pozorován podobný trend (ať už vyššího či nižšího) podílu plochy meristematických oblastí na celkové ploše řezu ESM. Pro přesnější zhodnocení situace by proto bylo vhodné použít více kousků (kupek) ESM. Již dříve byla studována tato problematika v diplomové práci Kadlecová (2013) s podobným cílem (tj. zjistit, zda kultury rostoucí na médiu s *mT* mají větší poměrné zastoupení meristematických struktur než ve variantě s BAP), s velmi podobnou metodikou, ale u jiných embryogenních linií a pouze v proliferaci. Stejně jako u linie C, ani v této práci nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly mezi variantami ve prospěch *mT* ošetření.

Dále se v souvislosti se signifikantně vyšším počtem zralých SE v případě *mT* nabízí otázka, zda záměna aplikovaného cytokininu ovlivnila velikost kotyledonárních SE. Signifikantně delší SE byla pozorována v 7. týdnu maturace u varianty *mT* linie C, tato SE byla přibližně stejně dlouhá jako SE linie AFO541 v 6. a 7. týdnu maturace (Svobodova et al., 1999). Co se týče porovnání, tak v práci Mamun et al. (2018) se autoři snažili synchronizovat vývoj SE *Picea abies* prostřednictvím rozptýlení kousků ESM. U rozptýlených embryogenních kultur byla ve většině případů v 8. týdnu maturace pozorována v průměru delší SE než u nerozptýlených kultur. Jak již bylo diskutováno u výtěžnosti, otázkou zůstává, zda je tento trend ve velikosti způsoben pouze rozptylem a následnou synchronizací nebo i případně lepší dostupností látek z média. Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, tak u rozptýlených embryogenních kultur dozrálo více SE, nicméně procento vyklíčených SE bylo v tomto případě nižší než v případě nerozptýlených embryogenních kultur (Mamun et al., 2018). Lze tedy shrnout, že záměna aplikovaného cytokininu u linie C ve většině případů výrazně neovlivnila velikost kotyledonárních SE, kromě signifikantně delších SE v případě *mT* v 7. týdnu maturace.

### 7.3 Markery pravidelného vývoje

Již jsem diskutovala několik rozdílů mezi variantami BAP a *mT*, které byly ovšem pravděpodobně způsobeny časovým posunem vývoje. Z hlediska posloupnosti jednotlivých stádií vývoje jsem

nepozorovala žádné odchylky při použití *mT*, proto jsem si dále položila otázku, zda se SE u obou variant vyvíjí dle pravidelného plánu i z hlediska dalších typů analýz. Vývoj kvalitních SE je charakterizován poklesem v obsahu celkových sacharidů a zvyšujícím se poměrem sacharóza/hexózy (SUC/HEX) v izolovaných SE. Tyto charakteristické trendy považujeme za biochemický marker pravidelného vývoje u správně se vyvíjejících kultur (Lipavská and Konradová, 2004; Lipavská et al., 2000). Oba trendy byly potvrzeny u linie C a již dříve také u linie AFO541 (Lipavská et al., 2000) a u linie C110 (Hudec et al., 2016). Stejně jako u linie C převažovaly v časných fázích vývoje v rámci ESM hexózy i v embryogenní kultuře *Pseudotsuga menziesii* (Gautier et al., 2019). Mimo to se v časných fázích vývoje vyskytuje i malé množství sacharózy, které bylo u *Pinus taeda* spojené se schopností embryogenní kultury tvořit normální SE (Robinson et al., 2009). Pokles v obsahu glukózy během vývoje SE může být připisován její bezprostřední roli v procesu růstu a vývoje, kdy glukóza představuje hlavní zdroj uhlíku a energie. Sacharóza představovala hlavní sacharid v izolovaných SE, to je v souladu s myšlenkou, že během maturace dochází k hromadění zásobních látek (Lipavská and Konradová 2004). Nyní se vrátím zpět k výše zmíněnému zvyšujícímu se SUC/HEX poměru, který byl u linie C v případě *mT* signifikantně vyšší než u BAP. U varianty BAP se SUC/HEX poměr nedostal na tak vysoké hodnoty jako u *mT* ani na konci maturace. Tento trend by mohl naznačovat, že v případě *mT* varianty je vývoj SE rychlejší, a lze předpokládat, že souvisí s rychlejším přechodem od metabolického ke skladovacímu sinku a bude doprovázen změnami v aktivitách klíčových enzymů podílejících se na sacharidovém metabolismu. Předpokládám, že dochází k přesunu aktivity od invertáz (převažují v časných fázích vývoje a dávají vznik vyššímu obsahu hexóz potřebných pro rychlý růst a buněčné dělení embryogenní kultury) k sacharózasyntáze (převažuje v pozdějších fázích vývoje během ukládání zásobních látek a diferenciaci buněk) (Konradová et al., 2002). Kromě toho glukóza a sacharóza jsou obecně považovány za signální molekuly, z nichž každá ovlivňuje vývojové procesy jiným způsobem. Změny SUC/HEX poměru by tedy mohly představovat určitou změnu v signalizaci. Tento fakt by mohl být pro somatickou embryogenezi důležitý, nicméně neexistuje práce, která se této otázce věnovala u tohoto procesu. Je tedy možné shrnout, že u linie C byl potvrzen trend snižujícího se obsahu hexóz a zvyšujícího se obsahu sacharózy během vývoje SE, který potvrzuje normální průběh dynamiky rozpustných sacharidů

Dalším markerem pravidelného vývoje je nízký obsah škrobu v rámci ESM a vysoký obsah škrobu v izolovaných SE (Lipavská et al., 2000), u linie C se tento trend potvrdil. Nicméně se nejedná o univerzální marker, např. u *Picea glauca* a *Picea mariana* docházelo k největšímu hromadění škrobu během prvních dvou týdnů maturace a později byly hladiny škrobu konstantní (Iraqi and Tremblay, 2001). Na druhou stranu ektopické hromadění škrobu značí určitou abnormalnost vývoje, např. u poškozených částí SE, které tzv. kalusovatěly, došlo ke ztrátě integrity původně celistvé povrchové struktury (Svobodová et al., 1999). Škrob představuje zásobní sacharid, který SE posléze potřebuje ke svému dalšímu vývoji. K nárůstu obsahu škrobu došlo i v izolovaných SE linie AFO541. Nejvyšší obsah škrobu byl pozorován v izolovaných SE ve fázi, kdy se zakládaly dělohy. Zatímco v závěru maturace, tedy u SE pokládáných za strukturně i biochemicky zralé a připravené pro další fáze procesu (desikace, klíčení), byl pozorován

signifikantní pokles v obsahu škrobu (Lipavska et al., 2000). Tento trend byl u linie C pozorován v případě *mT* při 2. opakování experimentu, kdy došlo k poklesu obsahu škrobu v 6. týdnu maturace v porovnání s 5. týdnem. Se škrobem se spojuje i výše zmíněná ektopická akumulace, proto je vhodné kombinovat stanovení obsahu škrobu kapalinovou chromatografií s jeho histochemickou lokalizací pomocí Lugolova činidla. U linie C jsem si v rámci práce s trvalými preparáty připravila řezy pro histochemickou lokalizaci škrobových zrn, zatím jsem se ovšem nedostala k dalšímu zpracování. Shrnu bych, že záměna BAP za *mT* významně neovlivnila profil akumulace škrobu, nicméně pro lepší představu by bylo vhodné stanovení obsahu škrobu kapalinovou chromatografií doplnit histochemickou lokalizací škrobových zrn.

## 7.4 Antioxidační systémy

Jak již bylo uvedeno ve Výsledcích (viz kapitola 6.2 a 6.7), varianta BAP v pozdějších fázích maturace a také při prodlouženém subkultivačním intervalu během proliferace vykazovala dříve a častěji známky typické pro stárnoucí kultury - hnědnutí embryogenní kultury. Hnědnutí kultury je typicky výsledkem oxidace nahromaděných fenolických látek (Baskaran et al., 2015; Dong et al., 2016; Laukkanen et al., 2000; Sahebi et al., 2016) a předpokládá se, že se jedná se o následek oxidativního stresu, který může způsobit buněčnou smrt (Dong et al., 2016; Laukkanen et al., 2000). Nicméně z prostudované literatury není zcela zřejmé, zda zmínění autoři mají na mysli programovanou buněčnou smrt či jiný typ odumření v důsledku oxidativního poškození. Hnědnutí kultur *in vitro* se pokládá všeobecně za nežádoucí jev a jsou vypracovány postupy, jak mu zabránit (např. přidávkem antioxidantů do média) (Irshad et al., 2018). Na základě dlouhodobého sledování embryogenní kultury jsem během prováděných experimentů pozorovala, že s výrazným hnědnutím kultury souviselo často následné snížení počtu a kvality SE (např. „kalusovatění“ či tloustnutí SE) (viz kapitola 6.2). Na druhou stranu fenolické látky jsou nezbytné při ochraně proti UV záření, fungují jako antioxidanty (v redukované formě) podílející se na zhášení reaktivních forem kyslíku a slouží jako prekurzory syntézy řady velice důležitých látek (např. ligninu) (Aremu et al., 2012b). Během mikropropagace u *Musa* sp. bylo u pěstovaných rostlin pozorováno větší množství fenolických látek při použití *mT* (a jeho derivátů) než při použití BAP. Tento trend potvrzuje fakt, že fenolické látky, ale i jiné sekundární metabolity a jejich případné hromadění, souvisí s lepší aklimatizací a následným přežitím při přenosu do nesterilních podmínek (Aremu et al., 2012b). Problém s hnědnutím kultur spojených s hromaděním oxidovaných forem fenolických látek byl pozorován i u jiných rostlinných druhů během mikropropagace - např. u *Pinus sylvestris* (Laukkanen et al., 1999), *Phoenix dactylifera* (Al-Khayri and Naik, 2017), ale i během somatické embryogeneze - např. u *Conostephium pendulum* (Anthony et al., 2004), u *Aloe pruinosa* (Baskaran et al., 2015). Pokusím se tedy zodpovědět otázku, zda se varianty lišily v obsahu fenolických látek. Ke stanovení jejich obsahu existují dva odlišné přístupy – biochemické stanovení (např. spektrofotometrické stanovení obsahu celkových fenolických látek, stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), kdy se stanovuje obsah jednotlivých fenolických kyselin) a histochemická lokalizace v rámci rostlinného pletiva. Nicméně biochemické a histochemické metody nedetekují striktně stejné látky. Kombinací výsledků z obou typů analýz lze

získat celkově lepší představu o obsahu a lokalizaci u takto heterogenní skupiny látek, kterou fenolické látky dozajista představují. Pro linii C jsem si z biochemických metod vybrala spektrofotometrické stanovení obsahu celkových fenolických látek a z histochemické lokalizace jsem si vybrala lokalizaci pomocí činidla Fast Blue B a vanilinu s HCl. Nicméně histochemická lokalizace fenolických látek se mi nepodařila. Pravděpodobně došlo k chybě během přípravy testovacích činidel nebo jsem nezvolila vhodné stádium vývoje, během kterého jsem tuto metodiku testovala. U linie AFO541 Svobodova et al. (1999) potvrdila hromadění fenolických látek v povrchových vrstvách SE, často u SE s abnormální morfologií. Co se týče biochemického stanovení, tak vysoký obsah celkových fenolických látek byl detekován v izolovaných SE. Hladiny fenolických látek byly v izolovaných SE tak vysoké, že jsou to právě vyvíjející se SE, která jsou hlavním místem akumulace, a zbytek kultury k obsahu fenolických látek přispívá minimálně. K signifikantním změnám v obsahu fenolických látek docházelo v odlišných týdnech maturace různě u obou variant. Pozorované změny nebyly mezi oběma opakováními experimentu konzistentní a přikláním se k názoru, že záměna BAP za *mT* významně neovlivňuje profil akumulace fenolických látek. Ovšem není možné vyloučit, že nedochází ke změnám v obsahu jednotlivých skupin látek či jednotlivých fenolických kyselin, což by odhalila např. studie s využitím metod HPLC (např. Vondrakova et al., 2020).

Jelikož rozdíly v obsahu celkových fenolických látek mezi variantami byly poměrně malé, předpokládala jsem, že hnědnutí mohlo být způsobeno rozdílnou mírou oxidace fenolických látek. Proto byly další analýzy zaměřeny na stav vybraných nízkomolekulárních antioxidačních systémů – na obsah kyseliny askorbové, konkrétně její redukované formy (ASC), a na obsah redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu a jejich vzájemný poměr. Kyselina askorbová a glutathion představují sloučeniny, které významně ovlivňují vývoj embryí během zygotické ale i somatické embryogeneze (Pullman et al., 2015). Obě sloučeniny jsou důležitými antioxidanty podílejícími se na regulaci hladin reaktivních forem kyslíku, a chrání tak buňky před oxidativním stresem (Noctor et al., 2012). Glutathion (GSH)/glutathion disulfid (GSSG) a kyselina askorbová (ASC)/dehydroaskorbát (DHA) představují 2 hlavní (redoxní) páry, které spolu s látkami tohoto typu udržují rovnováhu redoxního systému v buňkách (Pullman et al., 2015).

U linie C byl signifikantně vyšší obsah kyseliny askorbové pozorován u *mT* v 1. a zejména pak v 5. týdnu maturace v izolovaných SE. V 5. týdnu maturace došlo k řádovému nárůstu obsahu kyseliny askorbové, což by mohlo značit její význam v reakci pro přípravu následujících fází vývoje a případnou snazší aklimatizaci. Nicméně vypovídací hodnota obsahu pouze jednoho člena z redoxního páru není kompletní. Pro lepší představu o celkovém obsahu kyseliny askorbové by bylo nutné provést analýzu, kde bychom zjistili obsah její redukované i oxidované formy a tedy i jejich vzájemný poměr. Vysoká hladina kyseliny askorbové byla u SE *Picea abies* pozorována již dříve v časných fázích vývoje během embryogeneze, kde se podílí hlavně na detoxikačních procesech odstraňováním reaktivních forem kyslíku produkovaných oxidačním metabolismem rychle rostoucích buněk stejně tak jako buněčným dělením (Belmonte and Stasolla, 2009).

Vyšší obsah celkového glutathionu byl u linie C pozorován v případě *mT* v proliferaci, 3. a 5. týdnu maturace, nicméně signifikantní zvýšení bylo zjištěno pouze v proliferaci. Co se týče

podílu GSH/GSSG, tak v proliferaci a 1. týdnu maturace byl pozorován vyšší podíl GSH/GSSG v případě *mT*, nicméně k signifikantnímu zvýšení došlo pouze v 1. týdnu maturace. Již dříve byla vysoká hladina GSH pozorována hlavně v meristematických buňkách vyvíjejících se SE u *Picea abies*, kde byla vyžadována pro množení buněk, diferenciaci (Belmonte and Stasolla, 2009) a také se předpokládá, že je potřeba pro správné provedení programované buněčné smrti, což je nezbytná událost během časného vývoje SE u smrku (Bozhkov et al., 2002). U embryogenních linií *Picea glauca* optimální vývoj raných SE v proliferaci a časných fázích maturace nastal v přítomnosti redukovaných látek (vysoký poměr ASC/DHA a GSH/GSSG), zatímco pro pozdější fáze vývoje embrya během pozdních fází maturace, desikace a klíčení je vyžadována spíše přítomnost oxidovaných látek (Belmonte et al., 2005; Stasolla, 2010), podobný trend byl pozorován i v případě zygotických embryí a samičího gametofytu u *Pinus taeda* (Pullman et al., 2015). Navíc se zdá, že více než celkový obsah GSH a GSSG je důležitější jejich vzájemný poměr (Yeung et al., 2005). Je tedy možné shrnout, že záměnou BAP za *mT* se signifikantně zvýšil obsah kyseliny askorbové na konci vývoje SE, a naopak k signifikantnímu zvýšení obsahu celkového glutathionu došlo na počátku vývoje SE. Nicméně experimenty byly provedeny pouze jednou a stanovení vybraných nízkomolekulárních antioxidačních látek bylo provedeno pouze ve vybraných týdnech. Proto by bylo třeba výše zmíněná zjištění potvrdit zopakováním experimentů.

## 7.5 Fytohormony

Fytohormony představují látky regulující růst a vývoj rostlin. Jedná se o skupinu signálních látek, které se vzájemně ovlivňují. Jelikož jsem v práci sledovala vliv záměny ve složení cytokininů, je na místě položit si otázku, zda se u linie C měnily hladiny i jiných vybraných fytohormonů. Chování embryogenních kultur během indukce a proliferace je řízeno auxiny a cytokiny (Vondrakova et al. 2016). Spíše než absolutní obsahy auxinů a cytokininů reguluje vývoj SE v raných fázích somatické embryogeneze jejich vzájemná rovnováha či jejich poměr.

U linie C byl pozorován nejnižší obsah auxinů v proliferaci, kdy převažující složkou byla kyselina oxo-indol-3-octová (OxIAA) a kyseliny fenyloctová (PAA) (viz Graf 11). V maturaci došlo ke zvýšení obsahu celkových auxinů díky nárůstu kyseliny indol-3-octové (IAA), což by se mohlo vysvětlit tím, že se SE začala polarizovat (Vondrakova et al., 2018). Převažující složkou spektra v maturaci u linie C byla PAA a IAA. Podobný trend týkající se obsahu a spektra auxinů byl pozorován během vývoje u linie AFO541, s tím rozdílem, že během celého vývoje byla převažující složkou jednoznačně PAA (Vondrakova et al., 2018). Pokud bychom se podívali na rozdíly mezi variantami v rámci linie C, tak u varianty BAP byl pozorován signifikantně vyšší obsah celkových auxinů v 1. týdnu maturace kvůli zvýšení obsahu PAA a IAA. Mimo tento případ nebyl pozorován žádný rozdíl v obsahu a spektru auxinů při záměně BAP za *mT*, to ale nevylučuje případné jemnější efekty na další, na těchto látkách závislých dějích.

Dále byl stanoven obsah ABA a jejích metabolických forem. U embryogenních kultur smrku je exogenní dodání ABA podmínkou pro zahájení maturace raných SE. Při nedostatku nebo úplné nepřítomnosti ABA v maturačním médiu dochází k aberantnímu vývoji, který je

charakterizován množstvím poškozených SE (Fischerova et al., 2008). U linie C se v proliferaci nevyskytuje téměř žádná ABA ani její metabolické produkty, protože není součástí média a kultura ji sama nesyntetizuje. K prudkému nárůstu endogenního obsahu ABA a jejích metabolitů dochází v maturaci. Výrazně převažující složkou ve spektru je volná kyselina abscisová (viz Graf 12). Podobný trend týkající se ABA byl pozorován i u linie AFO541, později během dalšího vývoje docházelo k postupnému snižování obsahu ABA na velmi malé množství (Vondrakova et al., 2018). Co se týče rozdílů mezi variantami v rámci linie C, tak ve 2. a 3. týdnu maturace bylo pozorováno signifikantně vyšší množství celkové ABA v případě *mT* varianty. Nicméně z prostudované literatury není zřejmé, co by tato signifikantní změna týkající se endogenního obsahu ABA ve prospěch *mT* mohla znamenat.

Kromě auxinů a ABA byl dále stanoven obsah jasmonátů. U linie C byl pozorován podobný trend jako u linie AFO541 týkající se nízkého obsahu celkových jasmonátů v proliferaci a 3. týdnu maturace (Graf 13). K nárůstu obsahu celkových jasmonátů docházelo postupně během klíčení (Vondrakova et al., 2018). Mezi variantami u linie C nebyly pozorovány žádné významné trendy či změny. Obecně se uvádí, že jasmonáty fungují jako signální molekuly v odpovědi rostlin na různé biotické a abiotické stresy a přispívají ke kontrole vývoje a růstu (Vondrakova et al., 2016), lze tedy předpokládat i významný podíl v řízení somatické embryogeneze, i když informace o účasti v tomto typu procesu nejsou k dispozici.

Poslední látky s růstovou aktivitou, jejichž obsah byl stanoven, jsou fenolické sloučeniny - kyselina salicylová a kyselina benzoová. Největší množství kyseliny salicylové u linie C bylo pozorováno v proliferaci. Trend v postupném snižování obsahu kyseliny salicylové během vývoje SE byl pozorován u linie C (viz Graf 14A), tak u linie AFO541 (Vondrakova et al., 2018). Co se týče vlivu záměny BAP za *mT* na obsah kyseliny salicylové, tak u linie C byl pozorován signifikantně vyšší obsah kyseliny salicylové v proliferaci, 1. a 2. týdnu maturace u varianty BAP. Obecně hraje kyselina salicylová důležitou roli při mikrobiálním napadení rostliny patogenem (Vondrakova et al., 2016). Kromě toho se v literatuře objevují informace o tom, že nízký obsah kyseliny salicylové by mohl souviset s lepší tolerancí k různým abiotickým stresům, zatímco vysoký obsah by mohl vyvolávat oxidativní stres, který by mohl vést k buněčné smrti (Jayakannan et al., 2015). Nicméně není jasné, co výše zmíněné signifikantní změny představují v procesu somatické embryogeneze, protože informace týkající se dynamiky kyseliny salicylové v tomto procesu jsou převážně popisné.

Naopak co se týče kyseliny benzoové, tak u linie C byl v proliferaci detekován její nízký obsah, stejně tak u linie AFO541 (Vondrakova et al., 2018). U linie C došlo k výraznému nárůstu obsahu kyseliny benzoové v 1. týdnu maturace (viz Graf 14B) a u linie AFO541 ve 3. týdnu maturace (Vondrakova et al., 2018). Při záměně BAP za *mT* byl u linie C pozorován signifikantně vyšší obsah kyseliny benzoové v 1. a 2. týdnu maturace u varianty BAP, nicméně stejně jako u kyseliny salicylové není jasné, co tato změna v procesu somatické embryogeneze znamená, jelikož práce studující tuto otázku jsou převážně popisné.

Již dříve a u jiné linie byl mou předchůdkyní vypěstován materiál pro stanovení obsahu a spektra cytokininů. Je jasné, že typ použitého cytokininu ovlivnil endogenní hladiny a spektrum cytokininů přímo v proliferaci. Mimo to se potvrdilo, že ještě na počátku maturace, minimálně první 3 týdny, byl detekovatelný daný cytokinin a jeho degradační produkty. Pokud bychom na základě literárních dat připustili, že s aplikací BAP je spojena tvorba toxických degradačních produktů, tak by tyto produkty mohly působit nejen v proliferaci, ale také na počátku maturace (Hrušková, osobní sdělení).

Je tedy možné shrnout, že záměna BAP za *mT* výrazně neovlivnila obsah a spektrum vybraných fytohormonů.

## 8 Závěr

Nahrazení BAP za *mT* během proliferace u embryogenní linie C smrku ztepilého:

- vedlo k vytvoření signifikantně vyššího počtu zralých somatických embryí (SE).
  - signifikantně vyšší počet SE nebyl spojen se změnou v poměrném zastoupení meristematických oblastí v časných fázích vývoje.
- způsobilo mírné urychlení vývoje SE během maturace, konkrétně časnější nástup prekotyledonárního a kotyledonárního stádia o 1 týden.
  - urychlení zrání embryí nebylo spojeno s žádnými výraznými změnami ve výsledné velikosti kotyledonárních SE.
- vedlo k posílení jednoho z markerů pravidelného vývoje SE – vyššího poměru obsahu sacharózy ku hexózám v izolovaných SE, a to bez ovlivnění celkové dynamiky obsahu rozpustných sacharidů.
- neovlivnilo významně obsah škrobu. U obou variant byl potvrzen nízký obsah škrobu v rámci ESM a vysoký obsah škrobu v izolovaných SE.
- nevedlo k výrazným změnám v obsahu a spektru vybraných fytohormonů.
- snížilo náchylnost embryogenní kultury k hnědnutí v pozdních fázích maturace nebo při prodloužení subkultivačního intervalu;
  - omezené hnědnutí nelze přičíst změnám v profilu hromadění celkových fenolických látek, nicméně nelze vyloučit, že nedošlo ke změnám v obsahu jednotlivých skupin látek.
  - byl pozorován trend změny redoxní rovnováhy kultury ve prospěch redukováného stavu.

## 9 Seznam použité literatury

- Ahmad, A., and Anis, M. (2019). Meta-topolin Improves In Vitro Morphogenesis, Rhizogenesis and Biochemical Analysis in *Pterocarpus marsupium* Roxb.: A Potential Drug-Yielding Tree. *Journal of Plant Growth Regulation* 38, 1007-1016.
- Al-Khayri, J.M., and Naik, P.M. (2017). Date palm micropropagation: Advances and applications. *Ciencia E Agrotecnologia* 41, 347-358.
- Amoo, S.O., Aremu, A.O., and Van Staden, J. (2012). In vitro plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 111, 345-358.
- Amoo, S.O., Finnie, J.F., and Van Staden, J. (2011). The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regulation* 63, 197-206.
- Amoo, S.O., and Van Staden, J. (2013). Influence of plant growth regulators on shoot proliferation and secondary metabolite production in micropropagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 112, 249-256.
- Anthony, J.M., Senaratna, T., Dixon, K.W., and Sivasithamparam, K. (2004). The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78, 247-252.
- Aremu, A.O., Bairu, M.W., Dolezal, K., Finnie, J.F., and Van Staden, J. (2012a). Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108, 1-16.
- Aremu, A.O., Bairu, M.W., Szucova, L., Dolezal, K., Finnie, J.F., and Van Staden, J. (2012b). Assessment of the role of meta-topolins on in vitro produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated 'Williams' banana. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 2265-2273.
- Aremu, A.O., Bairu, M.W., Szucova, L., Dolezal, K., Finnie, J.F., and Van Staden, J. (2012c). Shoot and root proliferation in 'Williams' banana: are the topolins better cytokinins? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 111, 209-218.
- Attree, S.M., Budimir, S., and Fowke, L.C. (1990). SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANTLET REGENERATION FROM CULTURED SHOOTS AND COTYLEDONS OF SEEDLINGS FROM STORED SEEDS OF BLACK AND WHITE SPRUCE (*PICEA-MARIANA* AND *PICEA-GLAUCA*). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 68, 30-34.
- Attree, S.M., Moore, D., Sawhney, V.K., and Fowke, L.C. (1991). ENHANCED MATURATION AND DESICCATION TOLERANCE OF WHITE SPRUCE *PICEA-GLAUCA* (MOENCH) VOSS SOMATIC EMBRYOS - EFFECTS OF A NON-PLASMOLYSING WATER-STRESS AND ABSCISIC-ACID. *Annals of Botany* 68, 519-525.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Dolezal, K., and Van Staden, J. (2007). Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 90, 15-23.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Dolezal, K., and van Staden, J. (2008). The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95, 373-379.



- Baskaran, P., Kumari, A., Naidoo, D., and Van Staden, J. (2015). In vitro propagation and biochemical changes in *Aloe pruinosa*. *Industrial Crops and Products* 77, 51-58.
- Belmonte, M.E., Macey, J., Yeung, E.C., and Stasolla, C. (2005). The effect of osmoticum on ascorbate and glutathione metabolism during white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 337-346.
- Belmonte, M.F., and Stasolla, C. (2009). Altered HbK3 expression affects glutathione and ascorbate metabolism during the early phases of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 904-911.
- Bozhkov, P.V., Ahn, I.S., and Park, Y.G. (1997). Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb et Zucc. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 75, 509-512.
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., and von Arnold, S. (2002). A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnology and Bioengineering* 77, 658-667.
- Bozhkov, P.V., and von Arnold, S. (1998). Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 104, 211-224.
- Businge, E., Bygdell, J., Wingsle, G., Moritz, T., and Egertsdotter, U. (2013). The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 149, 273-285.
- Chalupa, V. (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Communication Institute of Forest Czech Republik* 14, 65-90.
- Chang, H.S., Chakrabarty, D., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. (2003). Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via in vitro shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39, 129-134.
- Cortizo, M., de Diego, N., Moncalean, P., and Ordas, R.J. (2009). Micropropagation of adult Stone Pine (*Pinus pinea* L.). *Trees-Structure and Function* 23, 835-842.
- De Diego, N., Montalban, I.A., and Moncalean, P. (2010). In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees. *South African Journal of Botany* 76, 158-162.
- De Diego, N., Montalban, I.A., and Moncalean, P. (2011). Improved micropropagation protocol for maritime pine using zygotic embryos. *Scandinavian Journal of Forest Research* 26, 202-211.
- Debergh, P., Aitkenchristie, J., Cohen, D., Grout, B., Vonarnold, S., Zimmerman, R., and Ziv, M. (1992). RECONSIDERATION OF THE TERM VITRIFICATION AS USED IN MICROPROPAGATION. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30, 135-140.
- Doležal, K., and Strnad, M. (2017) Cytokiny- regulátory růstu rostlin, které dokážou mnohem více než jen regulovat dělení buněk. *Živa*. 149-152.

- Dong, Y.S., Fu, C.H., Su, P., Xu, X.P., Yuan, J., Wang, S., Zhang, M., Zhao, C.F., and Yu, L.J. (2016). Mechanisms and effective control of physiological browning phenomena in plant cell cultures. *Physiologia Plantarum* 156, 13-28.
- Egertsdotter, U. (2019). Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research* 34, 360-369.
- Elhiti, M., and Stasolla, C. (2012). IN VITRO PROPAGATION METHODS OF ORNAMENTAL CONIFERS WITH EMPHASIS ON SPRUCE SOMATIC EMBRYOGENESIS. *Propagation of Ornamental Plants* 12, 3-10.
- Escalona, M., Cejas, I., Gonzalez-Olmedo, J., Capote, I., Roels, S., Canal, M.J., Rodriguez, R., Sandoval, J., and Debergh, P. (2003) The effect of *meta*-topolin on plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. *InfoMusa* 12, 28-30.
- Filonova, L.H., Bozhkov, P.V., and von Arnold, S. (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51, 249-264.
- Fischerova, L., Fischer, L., Vondrakova, Z., and Vagner, M. (2008) Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in Norway spruce embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos. *Plant Cell Reports* 27, 435–441.
- Galuszka, P., Popelkova, H., Werner, T., Frebortova, J., Pospisilova, H., Mik, V., Kollmer, I., Schmulling, T., and Frebort, I. (2007). Biochemical characterization of cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 26, 255-267.
- Gautier, F., Eliasova, K., Leple, J.C., Vondrakova, Z., Lomenech, A.M., Le Mette, C., Label, P., Costa, G., Trontin, J.F., Teyssier, C., *et al.* (2018). Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* Mirb. *BMC Plant Biology* 18, 164.
- Gautier, F., Label, P., Eliasova, K., Leple, J.C., Motyka, V., Boizot, N., Vondrakova, Z., Malbeck, J., Travnickova, A., Le Mette, C., *et al.* (2019). Cytological, Biochemical and Molecular Events of the Embryogenic State in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. ). *Frontiers in Plant Science* 10, 118.
- Gentile, A., Frattarelli, A., Nota, P., Condello, E., and Caboni, E. (2017). The aromatic cytokinin meta-topolin promotes in vitro propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 128, 693-703.
- Gentile, A., Gutierrez, M.J., Martinez, J., Frattarelli, A., Nota, P., and Caboni, E. (2014). Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118, 373-381.
- Grossnickle, S.C., Folk, R.S., Abrams, S.R., Dunstan, D.I., and Rose, P.A. (1996). Performance of interior spruce seedlings treated with abscisic acid analogs. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 26, 2061-2070.
- Gupta, P.K., and Durzan, D.J. (1986). PLANTLET REGENERATION VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM SUBCULTURED CALLUS OF MATURE EMBRYOS OF PICEA-ABIES (NORWAY SPRUCE). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 22, 685-688.

- Hakman, I., and Von Arnold, S. (1985). PLANTLET REGENERATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PICEA-ABIES (NORWAY SPRUCE). *Journal of Plant Physiology* 121, 149-158.
- Hazubska-Przybyl, T., and Bojarczuk, K. (2008). SOMATIC EMBRYOGENESIS OF SELECTED SPRUCE SPECIES (PICEA ABIES, P. OMORIKA, P. PUNGENS 'GLAUCA' AND P. BREWERIANA). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 77, 189-199.
- Holub, J., Hanus, J., Hanke, D.E., and Strnad, M. (1998). Biological activity of cytokinins derived from Ortho- and Meta-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* 26, 109-115.
- Horgan, R., Hewett, E.W., Horgan, J.M., Purse, J., and Wareing, P.F. (1975). NEW CYTOKININ FROM POPULUS X ROBUSTA. *Phytochemistry* 14, 1005-1008.
- Howell, S.H., Lall, S., and Che, P. (2003). Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science* 8, 453-459.
- Hudec, L., Konradova, H., Haskova, A., and Lipavska, H. (2016). Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol. *Tree Physiology* 36, 548-561.
- Hussain, S.A., Ahmad, N., Anis, M., and Alatar, A.A. (2019). Influence of meta-topolin on in vitro organogenesis in *Tecoma stans* L., assessment of genetic fidelity and phytochemical profiling of wild and regenerated plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 138, 339-351.
- Iraqi, D., and Tremblay, F.M. (2001). The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 111, 381-388.
- Irshad, M., Rizwan, H.M., Debnath, B., Anwar, M., Li, M., Liu, S., He, B.Z., and Qiu, D.L. (2018). Ascorbic Acid Controls Lethal Browning and Pluronic F-68 Promotes High-frequency Multiple Shoot Regeneration from Cotyledonary Node Explant of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Hortscience* 53, 183-190.
- Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z., and Shabala, S. (2015) Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance. *Plant Growth Regulation* 76, 25-40.
- Kadlecová, M. (2013) Strukturální studie proliferační fáze somatické embryogeneze smrku ztepilého pod vlivem aromatických cytokininů. Diplomová práce.
- Kermode, A.R. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9, 155-195.
- Kong, L.S., Attree, S.M., and Fowke, L.C. (1997). Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. *Physiologia Plantarum* 101, 23-30.
- Konradova, H., Lipavska, H., Albrechtova, J., and Vreugdenhil, D. (2002). Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogeneses in Norway spruce: content of soluble saccharides and localisation of key enzyme activities. *Journal of Plant Physiology* 159, 387-396.
- Krogstrup, P. (1986) Embryo-like structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Canadian Journal of Forest Research* 16, 664-668.

- Laukkanen, H., Haggman, H., Kontunen-Soppela, S., and Hohtola, A. (1999). Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologia Plantarum* 106, 337-343.
- Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., and Hohtola, A. (2000). Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology* 20, 467-475.
- Lelu-Walter, M.A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M., and Paques, L.E. (2013). Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics & Genomes* 9, 883-899.
- Lipavska, H., and Konradova, H. (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40, 23-30.
- Lipavska, H., Svobodova, H., Albrechtova, J., Kumstyrova, L., Vagner, M., and Vondrakova, Z. (2000). Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36, 260-267.
- Madzikane-Mlungwana, O., Moyo, M., Aremu, A.O., Plihalova, L., Dolezal, K., Van Staden, J., and Finnie, J.F. (2017). Differential responses to isoprenoid, N-6-substituted aromatic cytokinins and indole-3-butyric acid in direct plant regeneration of *Eriocephalus africanus*. *Plant Growth Regulation* 82, 103-110.
- Mala, J., Machova, P., Cvrckova, H., Karady, M., Novak, O., Mikulik, J., Dostal, J., Strnad, M., and Dolezal, K. (2013). The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. *Biologia Plantarum* 57, 174-178.
- Mala, J., Machova, P., Cvrckova, H., Karady, M., Novak, O., Mikulik, J., Hauserova, E., Greplova, J., Strnad, M., and Dolezal, K. (2009). Micropropagation of Wild Service Tree (*Sorbus torminalis* L. Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins During Organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 341-348.
- Mamun, N.H.A., Aidun, C.K., and Egertsdotter, U. (2018). Improved and synchronized maturation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H.Karst.) somatic embryos in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54, 612-620.
- Montalban, I.A., De Diego, N., and Moncalean, P. (2011). Testing novel cytokinins for improved in vitro adventitious shoots formation and subsequent ex vitro performance in *Pinus radiata*. *Forestry* 84, 363-373.
- Naaz, A., Hussain, S.A., Anis, M., and Alatar, A.A. (2019). Meta-topolin improved micropropagation in *Syzygium cumini* and acclimatization to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 63, 174-182.
- Niedz, R.P., and Evens, T.J. (2010) The effects of benzyladenine and *meta*-topolin on in vitro shoot regeneration of a *Citrus citrandarin* rootstock. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 6, 45-53.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., and Foyer, C.H. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment* 35, 454-484.

- Pullman, G.S., Zeng, X.Y., Copeland-Kamp, B., Crockett, J., Lucrezi, J., May, S.W., and Bucalo, K. (2015). Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation-reduction agents. *Tree Physiology* 35, 209-224.
- Ramarosandratana, A.V., and Van Staden, J. (2003). Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74, 249-255.
- Robinson, A.R., Dauwe, R., Ukrainetz, N.K., Cullis, I.F., White, R., and Mansfield, S.D. (2009). Predicting the regenerative capacity of conifer somatic embryogenic cultures by metabolomics. *Plant Biotechnology Journal* 7, 952-963.
- Ruaud, J.N., Bercetche, J., and Paques, M. (1992) First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year old *Picea abies* plants. *Plant Cell Reports* 11, 563-566.
- Sahebi, M., Hanafi, M.M., and Azizi, P. (2016). Application of silicon in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52, 226-232.
- Salajova, T., Jasik, J., Kormutak, A., Salaj, J., and Hakman, I. (1996). Embryogenic culture initiation and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* x *Abies cephalonica*, and *Abies alba* x *Abies numidica*). *Plant Cell Reports* 15, 527-530.
- Sgueglia, A., Gentile, A., Frattarelli, A., Urbinati, G., Germana, M.A., and Caboni, E. (2019). Micropropagation of Sicilian cultivars with an aim to preserve genetic diversity in hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Plant Biosystems* 153, 720-724.
- Schwarzerova, K., Vondrakova, Z., Fischer, L., Borikova, P., Bellinvia, E., Eliasova, K., Havelkova, L., Fiserova, J., Vagner, M., and Opatrny, Z. (2010) The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. *BMC Plant Biology* 10, 89.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Solorzano-Cascante, P., Sanchez-Chiang, N., and Jimenez, V.M. (2018). Explant Type, Culture System, 6-Benzyladenine, Meta-Topolin and Encapsulation Affect Indirect Somatic Embryogenesis and Regeneration in *Carica papaya* L. *Frontiers in Plant Science* 9, 1769.
- Stasolla, C. (2010) Changes in the glutathione and ascorbate redox state trigger growth during embryo development and meristem reactivation at germination. In: Anjum, N.A., Umar, S., and Chan, M. Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants, XVII, 231-249.
- Stasolla, C., Kong, L.S., Yeung, E.C., and Thorpe, T.A. (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38, 93-105.
- Stasolla, C., and Yeung, E.C. (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74, 15-35.
- Strnad, M. (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* 101, 674-688.
- Strnad, M., Hanus, J., Vanek, T., Kaminek, M., Ballantine, J.A., Fussell, B., and Hanke, D.E. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench, cv Robusta). *Phytochemistry* 45, 213-218.

- Svobodova, H., Albrechtova, J., Kumstyrova, L., Lipavska, H., Vagner, M., and Vondrakova, Z. (1999). Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 209-221.
- Tarkowska, D., Dolezal, K., Tarkowski, P., Astot, C., Holub, J., Fuksova, K., Schmulling, T., Sandberg, G., and Strnad, M. (2003). Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* 117, 579-590.
- Tautorus, T.E., Fowke, L.C., and Dunstan, D.I. (1991). SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CONIFERS. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 69, 1873-1899.
- Vagner, M., Vondrakova, Z., Strnadova, Z., Eder, J., and Machackova, I. (1998). Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea Abies*. *Advances in Horticultural Science* 12, 11-18.
- Valero-Aracama, C., Kane, M.E., Wilson, S.B., and Philman, N.L. (2010). Substitution of benzyladenine with meta-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *Plant Growth Regulation* 60, 43-49.
- Van Staden, J., and Crouch N.R. (1996) Benzyladenine and derivatives- their significance and interconversion in plants. *Plant Growth Regulation* 19, 153-175.
- Van Staden, J., Zazimalova, E., and George, E.F. (2008) Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. 205-226. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G-J., and editors. *Plant propagation by tissue culture*.
- Vondrakova, Z., Cvikrova, M., Eliasova, K., Martincova, O., and Vagner, M. (2010). Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree Physiology* 30, 1335-1348.
- Vondrakova, Z., Dobrev, P.I., Pesek, B., Fischerova, L., Vagner, M., and Motyka, V. (2018). Profiles of Endogenous Phytohormones Over the Course of Norway Spruce Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 9, 1283.
- Vondrakova, Z., Eliasova, K., and Vagner, M. (2014). The anti-actin drugs latrunculin and cytochalasin affect the maturation of spruce somatic embryos in different ways. *Plant Science* 221, 90-99.
- Vondrakova, Z., Eliasova, K., Fischerova, L., and Vagner, M. (2015). Somatická embryogeneze jehličnanů. *Věda kolem nás*.
- Vondrakova, Z., Krajnakova, J., Fischerova, L., Vagner, M., and Eliasova, K. (2016) "Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis" in *Vegetative Propagation of Forest Trees*, eds Z.S. Park, J. Bonga and H.K. Moon. National Institute of Forest Science, 123-169.
- Vondrakova, Z., Malbeck, J., Travnickova, A., Cerny, R., and Cvikrova, M. (2020). Phenolic acids in selected scab-resistant and mildew-tolerant apple cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum* 42, 43.

- Werbrouck, S.P.O., Strnad, M., VanOnckelen, H.A., and Debergh, P.C. (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum* 98, 291-297.
- Werbrouck, S.P.O., Vanderjeugt, B., Dewitte, W., Prinsen, E., Vanonckelen, H.A., and Debergh, P.C. (1995). THE METABOLISM OF BENZYLADENINE IN SPATHIPHYLLUM-FLORIBUNDUM SCHOTT-PETITE IN RELATION TO ACCLIMATIZATION PROBLEMS. *Plant Cell Reports* 14, 662-665.
- Wojtania, A. (2010). EFFECT OF META-TOPOLIN ON IN VITRO PROPAGATION OF PELARGONIUM x HORTORUM AND PELARGONIUM x HEDERAEOFOLIUM CULTIVARS. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 79, 101-106.
- Yeung, E.C., Belmonte, M.F., Tu, L.T.T., and Stasolla, C. (2005). Glutathione modulation of in vitro development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41, 584-590.